



Universidade de Aveiro
2013

Departamento de Engenharia de Materiais e
Cerâmica

**Diogo Emanuel
Almeida Seabra**

**Estudos de bioatividade de nanoestruturas
de óxido de zinco**



**Diogo Emanuel
Almeida Seabra**

**Estudos de bioatividade de nanoestruturas
de óxido de zinco**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Materiais e Dispositivos Biomédicos, realizada sob a orientação científica da Doutora Maria Elizabete Jorge Vieira Da Costa, Professora auxiliar e da Doutora Maria Helena Figueira Vaz Fernandes, Professora associada do Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica (DEMaC) da Universidade de Aveiro.

Júri

Presidente Professor Doutor José Maria da Fonte Ferreira

Professor Associado da Universidade de Aveiro

Professor Doutor José Martinho Marques de Oliveira

Professor Coordenador da Universidade de Aveiro

Professora Doutora Maria Elisabete Jorge Vieira da Costa

Professora Auxiliar da Universidade de Aveiro

Agradecimentos

Ao longo deste trabalho tive o apoio de várias pessoas às quais não podia deixar de agradecer.

Em primeiro lugar agradeço especialmente às minhas orientadoras: Prof. Doutora Maria Helena Figueira Vaz Fernandes e Prof. Doutora Maria Elizabete Jorge Vieira da Costa pelo papel fulcral que desempenharam ao longo da minha dissertação com a sua disponibilidade para satisfazer as minhas dúvidas e por todas as suas sugestões, correções e o apoio constante demonstrado.

Ao pessoal do *Biolab* em especial à Erika Davim e à Nathalie Barroca por todo o apoio e disponibilidade para ajudar e esclarecer dúvidas.

Um especial agradecimento à Ana Pires pela sua ajuda na introdução no tema e disponibilidade constante em esclarecer quaisquer dúvidas.

Aos técnicos do Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica pelo imenso apoio e disponibilidade durante a realização desta dissertação.

Aos meus amigos, colegas de turma e ao pessoal da residência por todos os bons momentos passados e pelo papel que tiveram nos momentos de distração nas pausas do trabalho.

À minha mãe e ao meu irmão por todo o apoio prestado porque sem eles não teria chegado onde cheguei.

Palavras-chave

Óxido de zinco, nanopartículas, poliuretano, compósito, bioatividade

Resumo

Estudos recentes com compósitos de uma matriz polimérica biocompatível – poliuretano - com enchimento de nanopartículas de óxido de zinco indicaram que, para além de não citotóxicos, estes compósitos apresentavam a capacidade de induzir a precipitação de compostos relevantes para o processo de mineralização, quando imersos em fluido fisiológico sintético. Dada a ausência de bioatividade das matrizes de PU, associou-se essa propriedade à presença das nanoestruturas de ZnO nos compósitos. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial bioativo de nanopartículas de óxido de zinco e a sua influência na bioatividade de compósitos de PU/ZnO.

Foram sintetizadas nanopartículas de ZnO por precipitação química (ZnO P) e comparadas com nanopartículas comerciais de óxido de zinco (ZnO C), tendo-se observado que as nanopartículas de ZnO P possuíam maior área superficial específica e menor cristalinidade que as ZnO C. Foram preparados, através da técnica de evaporação de solvente, compósitos de PU com diferentes conteúdos de enchimento de nanopartículas de ZnO dos dois tipos. De modo a avaliar a respetiva capacidade bioativa, realizaram-se testes *in vitro* em meio acelular, por imersão das nanopartículas e dos compósitos em fluido fisiológico simulado (SBF).

Nas nanopartículas (ZnO P e ZnO C) após imersão em SBF não foi possível confirmar a presença de fosfatos de cálcio típicos de materiais potencialmente bioativos, mas foram encontrados outros compostos, como fosfato de zinco, que precipitaram em competição com os outros fosfatos. A quantidade de zinco libertada para a solução a partir do pó de ZnO P foi significativamente superior à verificada com o pó comercial. Em ambos os casos ocorreu uma depleção significativa de cálcio e fósforo presentes na solução, sugerindo a sua contribuição para a precipitação de compostos com Ca e P.

Os resultados do trabalho permitiram genericamente concluir que a presença de nanopartículas de ZnO, isoladamente ou como reforço em compósitos de PU/ZnO, é relevante para a precipitação de fosfatos associados ao potencial bioativo desses materiais. A elevada degradação das nanoestruturas de ZnO em meio aquoso mostrou ser controlada através da inclusão dessas nanoestruturas em compósitos de matriz de PU, o qual parece funcionar como barreira à difusão das espécies resultantes da degradação das partículas.

A possibilidade de controlar, desta forma, a degradação das nanoestruturas de ZnO e a melhor compreensão dos processos de formação, à superfície desses materiais, de precipitados com potencial bioativo, contribuirão para colocar, a curto prazo, as nanopartículas de óxido de zinco precipitado no painel dos materiais com potencialidade para aplicações biomédicas, em particular na área da regeneração óssea.

keywords

Zinc oxide, nanoparticles, composite, polyurethane, bioactivity.

abstract

Recent studies with composites of a biocompatible polymer matrix - polyurethane - filled with zinc oxide nanoparticles indicated that, in addition to non-cytotoxic, these composites showed the ability to induce precipitation of relevant compounds for the mineralization process, when immersed in simulated body fluid. Due to the absence of bioactivity of PU matrices, this property was related with the presence of ZnO nanostructures in the composite. In this context, the aim of this study was to evaluate the bioactive potential of zinc oxide nanoparticles and its influence on the bioactivity of PU / ZnO composites.

ZnO nanoparticles were synthesized by chemical precipitation (ZnO P) and compared with commercial zinc oxide nanoparticles (ZnO C). It was observed that ZnO P nanoparticles had a higher specific surface area and lower crystallinity than the ZnO C. PU/ZnO composites were prepared by a solvent evaporation technique, with different filler content of ZnO nanoparticles. In order to evaluate their *in vitro* bioactive capacity, tests were performed by immersing the nanoparticles and the composites in simulated body fluid (SBF).

It wasn't possible to confirm the presence of calcium phosphates typical of potentially bioactive materials in the nanoparticles (ZnO P and ZnO C) after immersion in SBF. Other compounds were found, such as zinc phosphate, which precipitated in competition with other phosphates. The amount of zinc released to the solution from the ZnO P powder was significantly higher than that observed with the commercial powder. In both cases, occurred a significant depletion of calcium and phosphorus present in the solution, suggesting the contribution to precipitation of Ca and P compounds.

The results of the study allow to conclude that the presence of ZnO nanoparticles, alone or as reinforcement in the PU/ZnO composite is relevant for the precipitation of phosphates associated with bioactive potential of these materials. The high degradation of ZnO nanostructures in aqueous medium proved to be controlled by the inclusion of nanostructures in PU composite matrix, which appears to function as a barrier to the diffusion of species resulting from the degradation of the particles.

The possibility of controlling the degradation of ZnO nanostructures and a better understanding of the formation processes of surface precipitates with bioactive potential, contribute to place in the short term precipitated zinc oxide nanoparticles among the materials with potential for biomedical applications, particularly in the field of bone regeneration.

Índice

| | |
|--|-----|
| Lista de abreviaturas e símbolos | iii |
| Índice de figuras | v |
| Índice de tabelas | ix |
| Capítulo I..... | 1 |
| 1 Introdução | 3 |
| Capítulo II | 5 |
| 2. Revisão bibliográfica..... | 7 |
| 2.1 Bioatividade | 7 |
| 2.1.1 Etapas de formação da camada de HCA | 9 |
| 2.1.2 Composição e organização do osso..... | 10 |
| 2.1.3 Reparação óssea | 11 |
| 2.2 Materiais bioativos | 13 |
| 2.2.1 Vidros e Vitrocerâmicos bioativos..... | 13 |
| 2.2.2 Fosfatos de cálcio | 14 |
| 2.3 Óxido de zinco | 16 |
| 2.3.1 Citotoxicidade do óxido de zinco..... | 18 |
| 2.3.2 Interface ZnO/solução em meio aquoso..... | 19 |
| 2.3.3 O óxido de zinco e a bioatividade | 21 |
| 2.4 Compósitos PU/ZnO | 23 |
| 2.5 Poliuretano | 24 |
| Capítulo III | 27 |
| 3 Procedimento experimental..... | 28 |
| 3.1 Materiais e reagentes utilizados | 28 |
| 3.2 Síntese das nanoestruturas de óxido de zinco | 29 |
| 3.3 Preparação dos compósitos PU/ZnO..... | 31 |
| 3.4 Estudos de bioatividade..... | 33 |
| 3.4.1 Pós de óxido de zinco..... | 34 |
| 3.4.2 Bioatividade de compósitos PU/ZnO | 35 |
| 3.5 Técnicas de caracterização | 36 |
| 3.5.1 Difração de Raio - X (DRX) | 36 |
| 3.5.2 Microscopia eletrónica de varrimento (SEM) | 37 |
| 3.5.3 Adsorção gasosa para determinação de área superficial específica | 37 |

| | |
|--|----|
| 3.5.4 Espectroscopia de infravermelhos com Transformada de Fourier (FTIR)..... | 41 |
| 3.5.5 Calorimetria diferencial de varrimento (DSC) | 42 |
| 3.5.6 Análise de distribuição granulométrica | 42 |
| 3.5.7 Espectroscopia de emissão por plasma indutivo (ICP) | 42 |
| Capítulo IV | 43 |
| 4 Resultados e Discussão | 45 |
| 4.1 Caracterização dos materiais | 45 |
| 4.1.1 Caracterização das nanoestruturas..... | 45 |
| 4.1.2 Caracterização do poliuretano | 53 |
| 4.2 Caracterização dos materiais compósitos PU/ZnO | 56 |
| 4.3 Estudos de bioatividade..... | 59 |
| 4.3.1 Pós de óxido de zinco | 59 |
| 4.3.2 Compósitos de PU/ZnO..... | 65 |
| Capítulo V | 77 |
| 5 Conclusão e trabalho futuro | 79 |
| Referências | 82 |

Lista de abreviaturas e símbolos

| Abreviatura/símbolo | Descrição |
|---------------------------|--|
| ASE | Área Superficial Específica |
| BET | Isotérmica de <i>Braunauer-Emmett-Teller</i> |
| DEE | Diâmetro esférico equivalente |
| EDTA | Ácido etilenodiamino tetra-acético |
| FDA | <i>Federal Drug Administration</i> |
| FWHM | <i>Full width at half maximum</i> |
| HCA | Hidroxiapatite carbonatada |
| IUPAC | <i>Internacional Union of Pure and Applied Chemistry</i> |
| IV | Infravermelho |
| NP's | Nanopartículas |
| PVC | Policloreto de vinil |
| PU | Poliuretano |
| SBF | <i>Simulated body fluid</i> |
| TC | Tamanho de cristalite |
| TP_{médio} | Tamanho médio de poro |
| ROS | Espécies reativas de oxigénio |
| u.a. | Unidades arbitrárias |
| UE | União Europeia |
| UV | Ultravioleta |
| € | Euro |

Índice de figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Representação esquemática da formação da camada de HCA sobre a superfície de vidros bioativos em contato com SBF. Baseado em [13]. | 10 |
| Figura 2 - Ilustração das células ósseas e da matriz óssea. Retirado de [14]. | 11 |
| Figura 3 - Etapas da reparação óssea anteriormente descritas: (1) Formação de hematoma após uma fratura; (2) Formação do calo. O calo interno substitui o hematoma e o calo externo confere suporte; (3) Ossificação do calo. O osso esponjoso reticular substitui a cartilagem no calo; (4) A remodelação do osso substitui o osso reticular do calo e os fragmentos de osso morto. Retirado de [3]. | 12 |
| Figura 4 - Influência da composição (em percentagem de peso) de vidros e vidros cerâmicos do sistema $\text{CaO-SiO}_2\text{-Na}_2\text{O}$ na ligação óssea e aos tecidos moles. Todas as composições na região A possuem uma percentagem de peso constante de 6% de P_2O_5 . Baseado em [7]. | 14 |
| Figura 5 - Ilustrações representativas das estruturas cristalinas do óxido de zinco: (a) halite; (b) blenda e (c) wurtzite. Os átomos de zinco encontram-se representados a preto e os de oxigénio a cinzento. Retirado de [34]. | 16 |
| Figura 6 - Exemplos de diferentes tipos de nanoestruturas de óxido de zinco: a) nanobastonetes [43]; b) nanoanéis [44]; c) nanopregos [45]; d) nanoagulhas [46]; e) nanocasulos [47]; f) nanoflores [32]. | 18 |
| Figura 7 - Mecanismo de produção de ROS em presença de ZnO: sob radiação UV são produzidos lacunas (h^+) na banda de valência e eletrões (e^-) na banda de condução, resultando pares e^-/h^+ que originam ROS. Retirado de [60]. | 19 |
| Figura 8 – Esquema da dupla camada elétrica formada na superfície de nanopartículas de óxido de zinco, onde são visíveis as espécies com carga positiva (+) e negativa (-). Adaptado de [66]. | 29 |
| Figura 9 – Variação do potencial zeta em meio aquoso de nanopartículas de óxido de zinco em função do pH, incluindo a região para a qual o ZnO sofre dissolução. Adaptado de [70]. | 21 |
| Figura 10 - Formação do grupo uretano do PU através de reação química entre um poliál (OH-R-OH) e um diisocianato (O=C=R=C=O). Retirado de [91]. | 29 |
| Figura 11 – Fotografia do pulverizador usado no procedimento experimental (esquerda); Esquema ilustrativo do pulverizador evidenciando o seu princípio de funcionamento (direita). | 29 |
| Figura 12 – Esquema do procedimento experimental usado na síntese dos pós de óxido de zinco. | 30 |
| Figura 13 - Esquema ilustrativo da preparação de compósitos de PU/ZnO. O tamanho das membranas obtidas é comparado com uma moeda de 0,10 €. | 32 |
| Figura 14 - Esquema experimental adotado para os estudos de bioatividade das nanopartículas de ZnO. | 33 |
| Figura 15 - Classificação IUPAC dos vários tipos de isotérmicas de adsorção de gases. Adaptado de [94]. | 38 |
| Figura 16 - Classificação IUPAC dos ciclos de histerese (processos de adsorção/dessorção irreversíveis). Adaptado de [94]. | 39 |
| Figura 17 - Difractograma dos pós de óxido de zinco comerciais (ZnO C) e dos sintetizados pelo método da precipitação química (ZnO P). | 45 |
| Figura 18 - Micrografias do pó comercial de óxido de zinco (ZnO C) a diferentes ampliações. | 46 |

| | |
|---|----|
| Figura 19 - Micrografias dos pós precipitados de óxido de zinco (ZnO P) a diferentes ampliações. | 47 |
| Figura 20 – Micrografia do pó precipitados de óxido de zinco (ZnO P) após desgaste com papel abrasivo e pasta de diamante. | 48 |
| Figura 21 – Espectro de EDS do pó precipitado de óxido de zinco, onde se evidenciam os picos correspondentes aos elementos detetados na amostra: carbono (C), oxigénio (O), zinco (Zn) e alumínio (Al).. | 48 |
| Figura 22 - Distribuição granulométrica dos pós precipitados de óxido de zinco. | 49 |
| Figura 23 - Distribuição granulométrica do pó comercial de óxido de zinco com e sem desfloculante. | 50 |
| Figura 24 – Isotérmicas de adsorção/dessorção dos pós comerciais e precipitados.. | 50 |
| Figura 25 – Curvas de distribuição de tamanho de poro dos pós comerciais e precipitados..... | 51 |
| Figura 26 - Espectro de infravermelhos do pó precipitado (ZnO P) e do adquirido comercialmente (ZnO C)..... | 52 |
| Figura 27 – Difrátograma de raio – X de um filme de poliuretano puro..... | 53 |
| Figura 28 - Espectro de infravermelho do poliuretano comercial onde se assinalam as bandas de adsorção no infravermelho (A-P). | 54 |
| Figura 29- Curva DSC do filme de poliuretano puro..... | 55 |
| Figura 30 – Fotografia do filme de poliuretano puro (A) evidenciando o seu aspeto macroscópico e micrografia de SEM (B) ilustrando a microestrutura do mesmo filme. | 55 |
| Figura 31 – Imagem (a olho nu) dos vários tipos de compósitos preparados ao longo do trabalho com o pó precipitado (CP2, CP10 e CP50) e com o pó comercial (CC2, CC10 e CC50) bem como do filme de poliuretano puro (C0), e as respetivas constituições. | 56 |
| Figura 32 - Difrátogramas dos compósitos preparados com o pó precipitado (CP2, CP10 e CP50) e, para efeitos comparativos, do filme puro de poliuretano (C0)..... | 57 |
| Figura 33 – Espectros de infravermelho dos compósitos preparados com os pós comerciais e com os pós precipitados bem como do filme de poliuretano puro.. | 57 |
| Figura 34 - Micrografias dos pós de óxido de zinco precipitados (ZnO P) após 1 dia (A), 7 dias (B), 14 dias (C) e 21 (D) dias de imersão em SBF. As estruturas prismáticas encontram-se realçadas a amarelo. | 59 |
| Figura 35 – Micrografias de SEM dos pós comerciais de óxido de zinco (ZnO C) após 1 dia (A), 3 dias (B), 7 dias (B) e 21 dias (D) de imersão em SBF. As estruturas prismáticas encontram-se realçadas a amarelo. | 60 |
| Figura 36 – Espectros de difração de raio-X do ZnO P após 1, 7, 14 e 21 dias de imersão em SBF, As fases cristalinas associadas aos picos assinalados estão identificadas na tabela 11. | 61 |
| Figura 37 – Variação da razão Ca/P nos pós de óxido de zinco ao longo da imersão em SBF (linhas a tracejado para guiar os olhos), incluindo a razão Ca/P associada à hidroxiapatite - 1,67..... | 62 |
| Figura 38 – Evolução da concentração iónica de zinco em SBF ao longo dos tempos de imersão dos pós de óxido de zinco. | 63 |
| Figura 39 – Evolução da concentração iónica de cálcio em SBF ao longo dos tempos de imersão dos pós de óxido de zinco. | 63 |
| Figura 40 – Evolução da concentração iónica de fósforo em SBF ao longo dos tempos de imersão dos pós de óxido de zinco. | 64 |

| | |
|--|----|
| Figura 41 – Micrografias de SEM dos filmes de poliuretano após 1 (A) e 21 dias (B) de imersão em SBF..... | 65 |
| Figura 42 - Micrografias dos compósitos CP2 após 1 dia (A), 7 dias (B), 14 dias (C) e 21 dias (D) de imersão em SBF..... | 66 |
| Figura 43 - Espectro de EDS do compósito CP2 após um dia de imersão em SBF..... | 67 |
| Figura 44 - Espectro no infravermelho dos compósitos CP2, CP10 e CP50 após 7 dias de imersão em SBF..... | 67 |
| Figura 45 - Evolução da concentração iónica de zinco em SBF ao longo dos tempos de imersão dos compósitos CP2..... | 68 |
| Figura 46 - Evolução das concentrações iónicas de cálcio e fósforo em SBF ao longo dos tempos de imersão dos compósitos CP2..... | 69 |
| Figura 47 – Micrografias de SEM dos compósitos CP10 após 1 (A), 7 (B), 14 (C) e 21 dias (D) de imersão em SBF..... | 70 |
| Figura 48 - Evolução da concentração iónica de zinco em SBF ao longo dos tempos de imersão dos compósitos CP10..... | 70 |
| Figura 49 – Evolução das concentrações iónicas de cálcio e fósforo em SBF ao longo dos tempos de imersão dos compósitos CP10..... | 72 |
| Figura 50 - Micrografias de SEM dos compósitos CP50 após 1 (A), 7 (B), 14 (C) e 21 dias (D) de imersão em SBF..... | 72 |
| Figura 51 - Evolução da concentração iónica de zinco em SBF ao longo dos tempos de imersão dos compósitos CP50..... | 73 |
| Figura 52 - Evolução das concentrações iónicas de cálcio e fósforo em SBF ao longo dos tempos de imersão dos compósitos CP50..... | 73 |
| Figura 53 – Espectros de difração dos compósitos CP50 após 1, 14 e 21 dias de imersão em SBF, realçando do aparecimento do pico a $2\theta = 59,8^\circ$ | 74 |
| Figura 54 - Variação da razão Ca/P nos compósitos CP2, CP10 e CP50 ao longo do tempo de imersão em SBF..... | 75 |
| Figura 55 – Micrografias de Sem dos compósitos CC50 após 1 dia (A) e 21 dias (B) de imersão em SBF..... | 48 |
| Figura 56 – Evolução da concentração iónica de zinco em SBF ao longo dos tempos de imersão dos compósitos CC50..... | 76 |
| Figura 57 – Evolução das concentrações iónicas de cálcio e fósforo em SBF ao longo dos tempos de imersão dos compósitos CC50..... | 76 |

Índice de tabelas

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Concentrações iónicas (mM) e pH em SBF e no plasma humano. Adaptado de [10]..... | 15 |
| Tabela 2 - Exemplos de fosfatos de cálcio usados na indústria biomédica. Adaptado de [6,21,23]. | 15 |
| Tabela 3 - Número e percentagem de átomos superficiais em nanopartículas de arseneto de gálio (GaAs) com tamanho decrescente. Retirado de [41]...... | 17 |
| Tabela 4 - Materiais e reagentes utilizados na síntese das nanopartículas de óxido de zinco e na produção dos compósitos (incluindo a sua fórmula química, empresa fornecedora e grau de pureza). | 28 |
| Tabela 5 - Denominação dos materiais preparados com base na proveniência do óxido de zinco usado na sua síntese e na respetiva percentagem em peso no compósito. | 33 |
| Tabela 6 - Ordem de adição, fórmula química e quantidade dos reagentes utilizados na preparação de 1 litros de SBF..... | 52 |
| Tabela 7 - Algumas características dos pós comerciais (ZnO C) e precipitados (ZnO P). | 52 |
| Tabela 8 - Bandas de adsorção no infravermelho registadas no presente trabalho (figura 27) e respetiva referência na literatura. | 53 |
| Tabela 9 - Bandas de adsorção no infravermelho representadas na figura 29 e a respetiva correspondência observada na literatura. | 54 |
| Tabela 10 - Bandas de adsorção no infravermelho indicadas na figura 27 e a respetiva correspondência observada na literatura. | 58 |
| Tabela 11 – Identificação das fases cristalinas correspondentes aos picos assinalados na figura 36. | 61 |
| Tabela 12 – Bandas no infravermelho observadas nos compósitos após 7 dias de imersão em SBF em comparação com as descritas na literatura atribuídas à presença PO_4^{3-} | 68 |
| Tabela 13 - Correspondências possíveis do pico detetado na figura 53..... | 74 |

Capítulo I

1 Introdução

Os constantes avanços na medicina, maior preocupação com a alimentação e os estilos de vida saudáveis têm vindo sucessivamente a prolongar a esperança média de vida humana, originando o aumento significativo da população de idosos e, consequentemente, das doenças normalmente relacionadas com a velhice (como a osteoporose). A osteoporose caracteriza-se pela perda de massa óssea, o que torna os ossos mais finos, ocos e frágeis, aumentando dramaticamente o risco de fratura. No entanto, a incidência de fraturas não é limitada aos idosos, sendo também um problema nas camadas mais jovens da população (incluindo a população ativa). Anualmente ocorrem cerca de 2,2 milhões de intervenções cirúrgicas em todo o mundo com o objetivo de reconstruir ou substituir frações do tecido ósseo danificado por trauma ou doenças [1–3].

Segundo os dados apresentados no Congresso Europeu de Osteoporose e Osteoartrite de 2012 em Bordéus, o fardo financeiro total (incluindo a prevenção farmacêutica) das fraturas na União Europeia (UE) em 2010 foi estimado em 39 biliões de euros. Os custos mais elevados foram verificados nos cinco maiores países da UE: Alemanha (9,3 biliões), Itália (7,2 biliões), Reino Unido (5,6 biliões), França (5 biliões) e Espanha (2,9 biliões). Com o presente aumento generalizado da população idosa mundial (devido ao aumento da esperança média de vida), é esperado que os valores referidos anteriormente aumentem exponencialmente.

Os elevados custos envolvidos no tratamento de fraturas e o seu aumento generalizado (tendo em conta o aumento da esperança média de vida) têm dado origem à procura de novas soluções para aplicações ortopédicas.

Em estudos anteriormente conduzidos sob o tema “Compósitos PU/ZnO para aplicações biomédicas” [4] observou-se que a presença das nanopartículas de óxido de zinco nos compósitos PU/ZnO (poliuretano e óxido de zinco) conferia bioatividade a estes materiais (dado que o poliuretano é inerte), tendo-se inferido a possibilidade de aplicação dos compósitos em ortopedia.

Deste modo, é relevante analisar e aprofundar os indícios de bioatividade nas referidas nanoestruturas de óxido de zinco.

Não foram reportados estudos de bioatividade de nanoestruturas de óxido de zinco, o que torna este estudo pioneiro na área.

Assim, ao longo deste trabalho estudar-se-á a capacidade bioativa das nanopartículas de óxido de zinco precipitado comparativamente com a das nanopartículas de óxido de zinco comercial, bem como a sua influência no comportamento bioativo dos compósitos PU/ZnO.

A presente dissertação está dividida em 5 capítulos:

- O capítulo I intitulado “Introdução” aborda a motivação para a realização da dissertação, objetivos e estrutura da mesma.
- O capítulo II intitulado “Revisão bibliográfica” revê assuntos como o conceito de bioatividade e a sua origem, os materiais reportados como bioativos, as principais características do óxido de zinco e do poliuretano e compósitos de PU/ZnO.
- No capítulo III intitulado “Procedimento Experimental”, apresenta-se uma descrição detalhada do procedimento experimental seguido na síntese, preparação e caracterização dos vários materiais (nanopartículas de ZnO, filmes de poliuretano e compósitos PU/ZnO) e dos estudos de bioatividade realizados. Inclui também a descrição das técnicas de caracterização utilizadas ao longo do trabalho.
- No capítulo IV intitulado “Resultados e discussão” são apresentados e discutidos os resultados experimentais obtidos, nomeadamente os resultados referentes à caracterização dos materiais em estudo e aos estudos de bioatividade das nanoestruturas de óxido de zinco, filmes de poliuretano e dos compósitos PU/ZnO.
- No capítulo V intitulado “Conclusão e trabalho futuro” é feita uma síntese do trabalho realizado e apresentam-se algumas sugestões para estudos futuros.

Capítulo II

2. Revisão bibliográfica

A dimensão e a gravidade das patologias referidas no capítulo anterior levou ao desenvolvimento da investigação na área dos biomateriais. Um biomaterial, segundo a definição de Williams [5], é:

“Qualquer substância (que não droga) sintética ou natural, que possa ser usada como um sistema ou parte de um sistema para tratar, aumentar, ou substituir qualquer tecido, órgão, ou função do corpo”.

Segundo Larry Hench, consoante o tipo de resposta desenvolvido na interface tecido-implante, os biomateriais podem ser agrupados em quatro classes diferentes: inertes, porosos, bioativos e reabsorvíveis [6]:

- Inertes – São normalmente densos e sem porosidade. Verifica-se a formação de uma cápsula fibrosa em redor do impante (encapsulamento fibroso).
- Poroso – O crescimento de tecidos ocorre na direção dos poros (fixação biológica).
- Bioativos – Ocorre uma ligação forte na interface tecido-implante (ligação química).
- Reabsorvíveis – Os materiais são lentamente absorvidos e substituídos pelo tecido.

2.1 Bioatividade

O conceito de bioatividade foi introduzido relativamente aos vidros bioativos descobertos por Larry Hench em 1969. Os primeiros vidros foram desenvolvidos numa parceria entre Hench e o Departamento da Defesa dos Estados Unidos da América. Hench, ao partilhar uma viagem de autocarro com um coronel do exército norte-americano foi confrontado com uma realidade alarmante: o elevado número de amputados durante a Guerra do Vietname. Devido ao fato dos materiais usados na altura serem bioinertes, eram encapsulados pelo organismo, chegando a provocar reações de rejeição por parte do

organismo, resultando muitas vezes na amputação de membros o que diminuía seriamente a qualidade de vida [7–9].

Os vidros desenvolvidos por Hench evidenciaram algo surpreendente: ligaram-se ao osso, estabelecendo uma ligação física e química forte. Esta ligação era de tal modo pronunciada que a separação osso/implante não era evidente [1].

Hench definiu a bioatividade como a capacidade de um material para formar na sua superfície uma camada de hidroxiapatite carbonatada (HCA) que promove uma interface de ligação forte com os tecidos vivos. A fase de HCA que se forma na superfície é química e estruturalmente equivalente à fase mineral do osso. É esta equivalência que é responsável pela ligação interfacial, permitindo uma ligação química ao osso [6,7,9].

Para avaliar a capacidade bioativa de um material utiliza-se atualmente o SBF (*Simulated Body Fluid*). O SBF é uma solução acelular e aprotéica com concentrações iónicas próximas das do plasma sanguíneo humano. A importância de analisar a bioatividade *in vitro* antes de *in vivo* é bastante clara: estudos *in vivo* requerem o sacrifício de animais, são mais caros e difíceis de reproduzir. Assim, os testes de bioatividade são realizados inicialmente *in vitro*. Dentro dos testes *in vitro* identificam-se dois métodos: avaliação da capacidade de formação de apatite em soluções (nomeadamente em SBF), e avaliação da resposta celular ao material [10].

Na tabela 1 encontram-se os valores normais de concentrações iónicas (mM) e pH em SBF e no plasma humano.

Tabela 1 - Concentrações iónicas (mM) e pH em SBF e no plasma humano. Adaptado de [10].

| ião / pH | SBF | Plasma humano |
|-------------------------------------|------------|----------------------|
| Na⁺ | 142.0 | 142.0 |
| K⁺ | 5.0 | 5.0 |
| Mg²⁺ | 1.5 | 1.5 |
| Ca²⁺ | 2.5 | 2.5 |
| Cl⁻ | 147.8 | 103.0 |
| HCO₃⁻ | 4.2 | 4.2 |
| HPO₄²⁻ | 1.0 | 1.0 |
| SO₄²⁻ | 0.5 | 0.5 |
| pH | 7.25 | 7.20-7.40 |

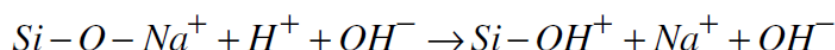
No entanto, alguns autores como Bohneret questionam a previsão de bioatividade em SBF, defendendo que o SBF não pode imitar as condições fisiológicas porque é baseado nas concentrações fixas e não a atividade de componentes-chave como os oligoelementos,

defendendo que o seu papel como elementos essenciais para o funcionamento do organismo não deve ser ignorado [7, 8]. Contudo, o uso do SBF como meio de previsão da bioatividade de um material é atualmente aceite pela maioria da comunidade científica [11].

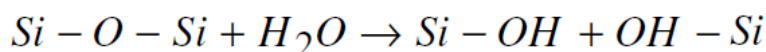
2.1.1 Etapas de formação da camada de HCA

Hench propôs que a formação de HCA ocorre em 5 etapas (figura 1), as primeiras das quais podem ocorrer em água destilada ou em SBF (não requerendo a presença de tecidos vivos) [12]:

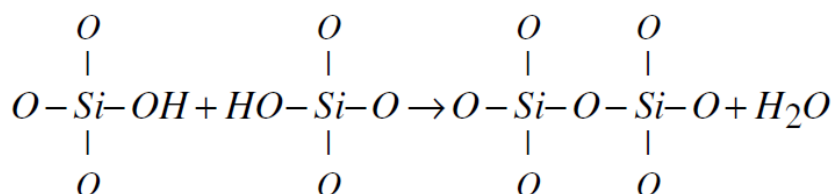
Etapa 1: Troca rápida entre iões alcalinos do vidro e iões H^+ existentes na solução:



Etapa 2: Quebra das ligações Si-O-Si e formação de grupos silanol (Si-OH) na interface vidro-solução:



Etapa 3: Condensação e repolimerização de grupos silanol e formação de uma camada superficial rica em sílica-gel desprovida de iões alcalinos e alcalino-terrosos:



Etapa 4: Migração de iões Ca^{2+} e PO_4^{3-} presentes na rede vítrea para a superfície da camada de sílica gel, através da estrutura bastante solta do gel, seguindo-se o crescimento de um filme amorfo de $CaO-P_2O_5$ por incorporação de iões Ca^{2+} e PO_4^{3-} provenientes da solução.

Etapa 5: Formação de uma camada de hidroxiapatite carbonatada por cristalização do filme amorfo com incorporação de aniões OH^- e CO_3^{2-} presentes na solução.

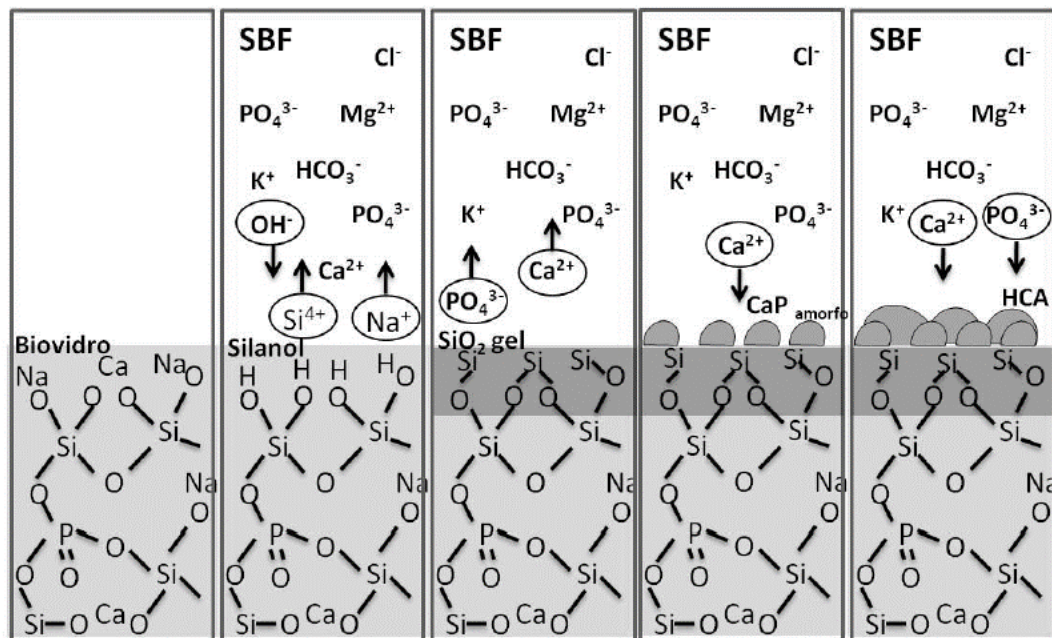


Figura 1 - Representação esquemática da formação da camada de HCA sobre a superfície de vidros bioativos em contato com SBF. Baseado em [13].

A definição de bioatividade proposta por Hench foca-se na semelhança da camada de HCA formada com o osso humano, pelo que este e o seu processo de regeneração são alvo de uma breve descrição:

2.1.2 Composição e organização do osso

O osso é uma estrutura presente nos vertebrados e possui uma importância fulcral nestes organismos. Confere suporte e proteção, possibilita os movimentos corporais, armazena iões minerais (como iões cálcio e fosfato necessários a uma grande variedade de funções metabólicas) e gordura e é um local de produção de células sanguíneas (na medula óssea) [3].

O osso é constituído pela matriz óssea e pelas células ósseas. A matriz é constituída aproximadamente por 35% de material orgânico (fundamentalmente colagénio e proteoglicanos) e 65% de material inorgânico (principalmente hidroxiapatite) [3].

As células ósseas dividem-se em osteoblastos, osteoclastos e osteócitos. Os osteoblastos são responsáveis pela síntese dos componentes orgânicos da matriz óssea (colagénio, proteoglicanos, glicoproteínas) e são capazes de concentrar fosfato de cálcio, participando na mineralização da matriz. Quando um osteoblasto fica rodeado pela matriz óssea, ele passa a chamar-se osteócito. Os osteócitos tornam-se relativamente inativos comparativamente com os osteoblastos embora lhes seja possível produzir alguns compostos necessários para manter a matriz óssea. Os osteoclastos são células grandes e com vários núcleos responsáveis pela reabsorção óssea. A matriz óssea recém-formada adjacente aos osteoblastos ativos chama-se osteóide [3,14] .

Na figura 2 encontra-se ilustrado o tecido ósseo, onde são visíveis as células ósseas e a matriz óssea.

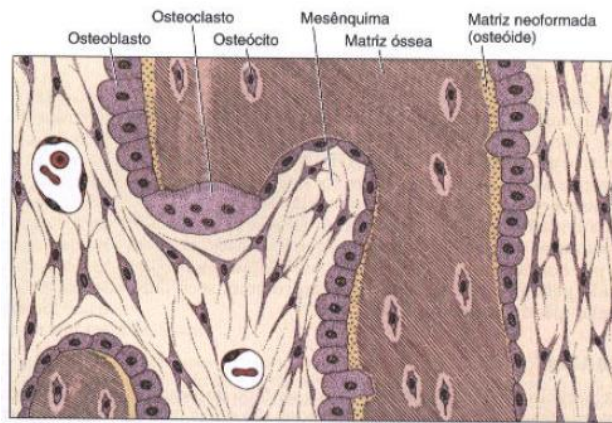


Figura 2 - Ilustração das células ósseas e da matriz óssea. Retirado de [14].

2.1.3 Reparação óssea

Como foi referido anteriormente, o osso é um tecido vivo que pode ser reparado após uma lesão. Este processo de reparação possui quatro etapas principais ilustradas na figura 3 [3]:

- 1- Formação do hematoma: Quando um osso sofre uma fratura, os vasos sanguíneos são lesados, originando um hematoma. A rutura dos vasos sanguíneos resulta na morte dos osteócitos devido ao aporte sanguíneo inadequado. Após a formação do hematoma ocorre a formação do calo ósseo.

- 2- Formação do calo ósseo: O calo ósseo é uma massa de tecido que se forma no local da fratura unido os topos ósseos fraturados. É constituído pelo calo interno (fibras e cartilagem) entre as extremidades quebradas do osso e pelo canal medular (se a fratura ocorrer na diáfise de um osso longo), e pelo calo externo (que forma um colar em torno dos topos opostos da fratura).
- 3- Ossificação do calo: Após a formação de cartilagem no calo externo, esta é substituída por osso esponjoso reticular através da ossificação dando origem a um calo externo mais forte. Finalmente as fibras e cartilagem são substituídas por osso esponjoso reticular estabilizando a fratura.
- 4- Remodelação óssea: A reparação não está completa enquanto o osso reticular do calo interno e o osso morto não forem substituídos por osso compacto. À medida que o interno se remodela e se torna mais forte, o calo externo diminui devido à ação dos osteoclastos. Se a fratura ocorrer na diáfise dum osso longo, a remodelação também restaura o canal medular (como é visível na etapa 4 na figura 3).

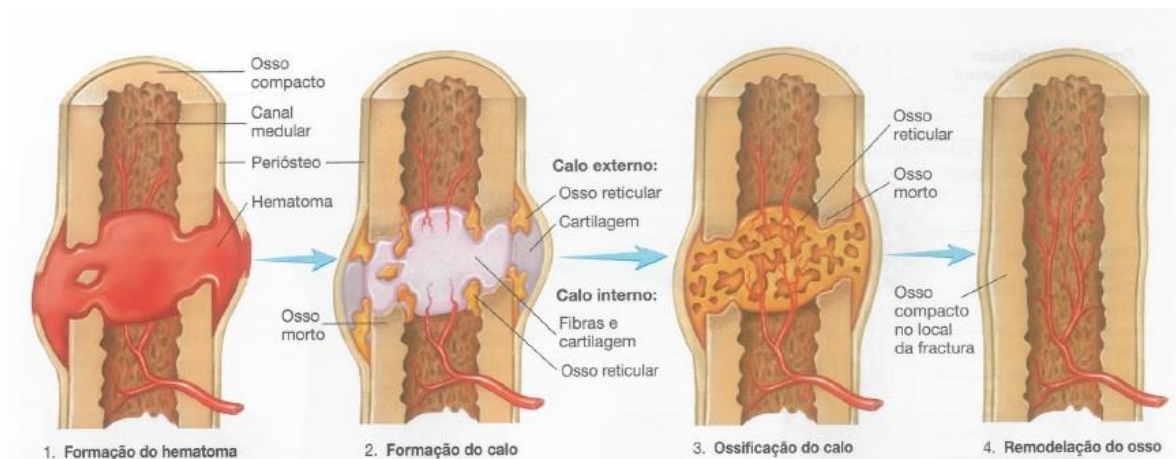


Figura 3 - Etapas da reparação óssea anteriormente descritas: (1) Formação de hematoma após uma fratura; (2) Formação do calo. O calo interno substitui o hematoma e o calo externo confere suporte; (3) Ossificação do calo. O osso esponjoso reticular substitui a cartilagem no calo; (4) A remodelação do osso substitui o osso reticular do calo e os fragmentos de osso morto. Retirado de [3].

Apesar do tratamento da maioria das fraturas ser relativamente simples, fraturas ósseas significativas (incluindo fraturas compostas) ou ressecção após cancro ósseo podem exigir um tratamento mais complexo. Nestes casos, são usados enxertos ósseos e biomateriais (incluindo materiais bioativos) [15,16].

2.2 Materiais bioativos

Os vidros bioativos, vidros cerâmicos bioativos e os fosfatos de cálcio encontram-se entre os materiais que são normalmente reportados como bioativos [17].

No entanto a indução de bioatividade não é limitada a estes materiais vítreos ou cerâmicos de fosfatos de cálcio, podendo ser observada noutros tipos de materiais e com outras composições e sobre superfícies especificamente preparadas para o efeito (isto é funcionalizadas) [17].

2.2.1 Vidros e Vitrocerâmicos bioativos

Como foi referido anteriormente, o estudo de materiais bioativos começou com a descoberta por Hench que vidros à base de sílica desenvolviam uma ligação forte ao osso. O primeiro vidro bioativo estudado foi o Bioglass 45S5® (conhecido em português por Biovidro) [8,9].

Uma propriedade importante dos vidros bioativos é que osso novo pode-se formar longe da interface osso-implante, a esta propriedade deu-se o nome de osteoprodução. A libertação de iões de cálcio (Ca^{2+}) e sílica (Si^{4+}) a partir da dissolução de vidros bioativos estimula a divisão celular de osteoblastos, a produção de fatores de crescimento e de proteínas de matriz extracelular (promovendo a formação de novo osso) [18,19].

Os vitrocerâmicos (ou vidros cerâmicos) bioativos são uma classe importante de materiais policristalinos produzidos por cristalização controlada do vidro. A maior parte dos vitrocerâmicos bioativos são baseados em composições análogas às do biovidro, embora todos possuam baixas concentrações de óxidos alcalinos. Entre os vitrocerâmicos bioativos mais comuns em aplicações ortopédicas encontram-se o Cervital® e o Cerabone® [20]. A composição dos vidros e vidros cerâmicos é uma variável importante na formação da camada de HCA e na ligação óssea. Essencialmente, um baixo teor em sílica origina uma rede de sílica menos conectada que é mais propensa à dissolução e consequentemente, etapas referidas anteriormente (figura 1) acontecem mais rapidamente [17].

Na figura 4 é visível um diagrama de fases ternário do sistema $\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{SiO}_2$ evidenciando o efeito da composição dos vidros e vidros cerâmicos bioativos na bioatividade:

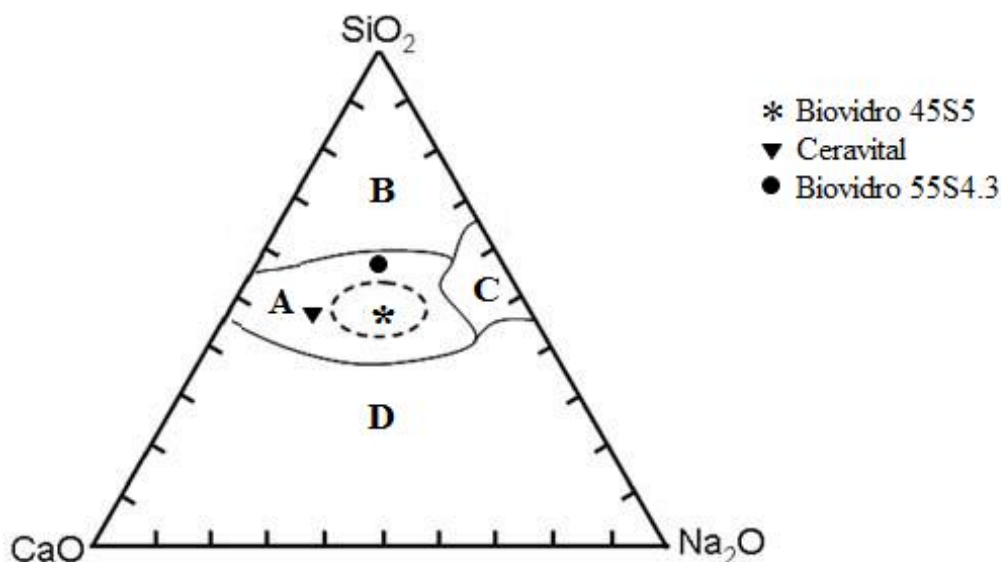


Figura 4 - Influência da composição (em percentagem de peso) de vidros e vidros cerâmicos do sistema $\text{CaO}-\text{SiO}_2-\text{Na}_2\text{O}$ na ligação óssea e aos tecidos moles. Todas as composições na região A possuem uma percentagem de peso constante de 6% de P_2O_5 . Baseado em [7].

Tanto vidros como vidros cerâmicos que possuam uma composição dentro da região A irão desenvolver HA tanto *in vitro* como *in vivo*, pelo que a região A é denominada fronteira bioativa. As composições dentro da linha tracejada ligam-se também com os tecidos moles. Os vidros na região B comportam-se quase como materiais inertes (promovendo a formação de encapsulamento fibroso). Os materiais da região C são reabsorvíveis e desaparecem entre 10 a 30 dias após a implantação. Quanto aos materiais da região D, estes não foram testados em implantes [6].

2.2.2 Fosfatos de cálcio

Os fosfatos de cálcio são uma família de compostos minerais constituídos por iões Ca^{2+} , iões fosfato (PO_4^{3-}) e ocasionalmente iões hidroxilo (OH^-). Como foi referido anteriormente, a fase mineral do osso humano consiste principalmente em iões fosfato e cálcio, com quantidades significativamente inferiores de iões magnésio, carbonato, zinco,

citrato, entre outros. Assim, os compostos de fosfato de cálcio ocorrem naturalmente no corpo humano, podendo aparecer também na natureza sob a forma de minerais e podem ser sintetizados em laboratório [6].

Os cerâmicos de fosfato de cálcio possuem variadas aplicações biomédicas (principalmente em ortopedia e odontologia) sendo usados para reparar defeitos ósseos, no aumento e manutenção de cristas ósseas alveolares, na recolocação de raiz dentária, em implantes auriculares, no revestimento de implantes metálicos, entre outros [21]. Entre os biomateriais de fosfato de cálcio mais comuns encontram-se a hidroxiapatite (sintética ou de origem natural (coral) ou biológica (a partir de osso bovino) e o trifosfato de cálcio (na sua forma α ou β) [22].

Uma forma conveniente de classificar os vários tipos de fosfato de cálcio é através da razão Ca/P (que pode variar entre 0,5 e 2,0). Na tabela 2 encontram-se algumas características relevantes dos tipos de fosfatos de cálcio mais usados na indústria biomédica.

Tabela 2 - Exemplos de fosfatos de cálcio usados na indústria biomédica. Adaptado de [6,21,23].

| Nome | Fórmula química | Razão Ca/P | Solubilidade | Usos comuns |
|--------------------------------------|--|------------|------------------------|--|
| Bifosfato de cálcio (DCP) | CaHPO_4 | 1.0 | $1,26 \times 10^{-7}$ | Cimentos ósseos, revestimentos |
| Octofosfato de cálcio (OCP) | $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | 1.33 | $5,01 \times 10^{-15}$ | Revestimentos, enxertos ósseos, precursor da HA, |
| Trifosfato de cálcio (TCP) | $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ | 1.50 | $2,83 \times 10^{-30}$ | Enxertos e cimentos ósseos, compósitos |
| Hidroxiapatite (HA) | $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ | 1.(6) | $2,35 \times 10^{-59}$ | Enxertos ósseos, revestimentos, compósitos |
| Tetrafosfato de cálcio (TTCP) | $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$ | 2.0 | - | Revestimentos, compósitos |

A solubilidade influencia a interação dos fosfatos de cálcio com o meio. Conforme a razão Ca/P aumenta, o produto de solubilidade dos fosfatos de cálcio diminui, diminuindo também a sua degradabilidade. As principais desvantagens dos fosfatos de cálcio residem nas baixas propriedades mecânicas em relação ao osso e microporosidade elevada, o que pode prejudicar o crescimento ósseo [21,24–27].

Na maior parte dos estudos que se focam em materiais bioativos (vidros bioativos, vitrocerâmicos bioativos fosfatos de cálcio) referem a importância das espécies iónicas libertadas para o meio envolvente como Ca^{2+} , Na^{2+} , Zn^{2+} , entre outros [28]. Esses estudos abrem a perspectiva de materiais como o óxido de zinco (que contém o ião Zn^{2+}) em estudos de bioatividade.

2.3 Óxido de zinco

O óxido de zinco é um composto inorgânico de fórmula química ZnO . É um material semicondutor e piezoelétrico, ocorrendo naturalmente sob a forma do mineral zincite. A wurtzite, a blenda e a halite (figura 5) são estruturas cristalinas típicas do óxido de zinco [29–33].

Em condições normais de pressão e temperatura, a fase termodinamicamente estável é a wurtzite. A blenda ocorre quando os cristais crescem sobre substratos com estrutura cristalina cúbica e a halite é característica de condições de pressão significativamente elevadas [34].

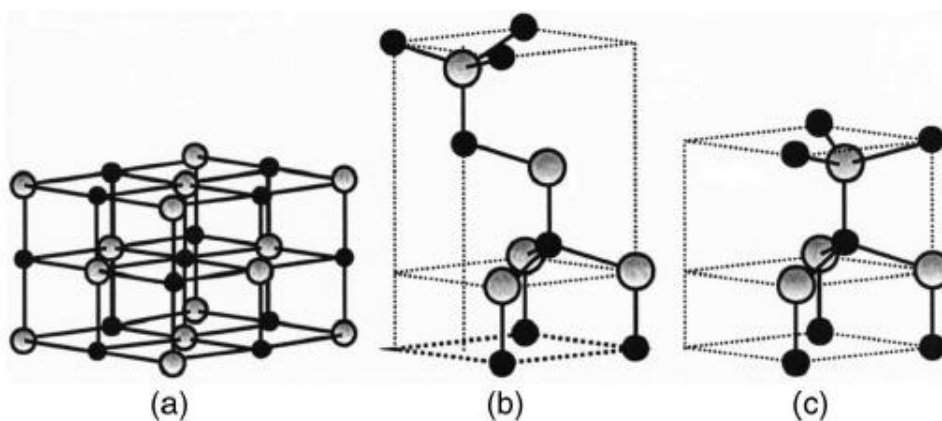


Figura 5 - Ilustrações representativas das estruturas cristalinas do óxido de zinco: (a) halite; (b) blenda e (c) wurtzite. Os átomos de zinco encontram-se representados a preto e os de oxigénio a cinzento. Retirado de [34].

O zinco é um dos oligoelementos mais abundantes no osso humano e tem um papel importante no metabolismo ósseo. Exerce efeitos estimulantes na formação de osso, bem como efeitos inibitórios na reabsorção óssea pelos osteoclastos [35,36]. Normalmente, os níveis fisiológicos de zinco são importantes numa variedade de processos de crescimento celular e de desenvolvimento do organismo. Os processos de osteointegração são mediados

por metaloproteínas, uma família de proteínases altamente específicas cujas atividades são reguladas pela presença de catiões divalentes como o Zn^{2+} [37].

A produção de ZnO com características manométricas tem permitido demonstrar a melhoria das propriedades químicas e físicas deste material quando considerado à escala nanométrica [38].

As nanopartículas diferem significativamente dos monólitos na medida em que apresentam diferentes propriedades e reatividade. Devido à diminuição de tamanho, o número de átomos superficiais aumenta, originando a uma razão superfície para volume superior, o que provoca um aumento da reatividade [39,40].

A tabela 3 mostra como varia o número de átomos superficiais com o tamanho de partícula. Os átomos à superfície possuem menos ligações com outros átomos, o que origina uma maior reatividade.

Tabela 3 - Número e percentagem de átomos superficiais em nanopartículas de arsineto de gálio (GaAs) com tamanho decrescente. Retirado de [41].

| Tamanho (nm) | Nº total de átomos | Nº de átomos superficiais | Percentagem de átomos superficiais |
|---------------------|---------------------------|----------------------------------|---|
| 56,5 | 8.06×10^6 | 1.2×10^5 | 1.5 % |
| 28,3 | 1.02×10^6 | 3.0×10^4 | 2.9 % |
| 14,1 | 1.29×10^5 | 7500 | 5.8 % |
| 8,48 | 2.84×10^4 | 2700 | 9.5 % |
| 3,39 | 1962 | 432 | 22.0 % |
| 2,26 | 620 | 192 | 31.0 % |
| 1,13 | 94 | 48 | 51.1 % |

As nanopartículas de óxido de zinco têm suscitado interesse na área da indústria biomédica devido à sua estabilidade e propriedades de fotoluminescência, sendo usadas no campo dos biossensores, dos agentes esterilizantes, de aditivos, protetores solares, sistemas de libertação de fármacos, entre outros [33], podendo ser produzidas por variados métodos como sol-gel, deposição química em fase de vapor (CVD), a precipitação química, sublimação e *sputtering* [31,42]. Através dos métodos acima enumerados é possível obter uma variedade significativa de morfologias como: nanobastonetes [43]; nanoanéis [44];

nanopregos [45]; nanoagulhas [46]; nanocasulos [47]; nanoflores [48]; pontos quânticos [49]; nanocubos [50]; nanoesferas [51]; nanotubos [52]; nanofios [33]; entre outros [30]. Algumas das nanoestruturas enunciadas encontram-se ilustradas na figura 6:

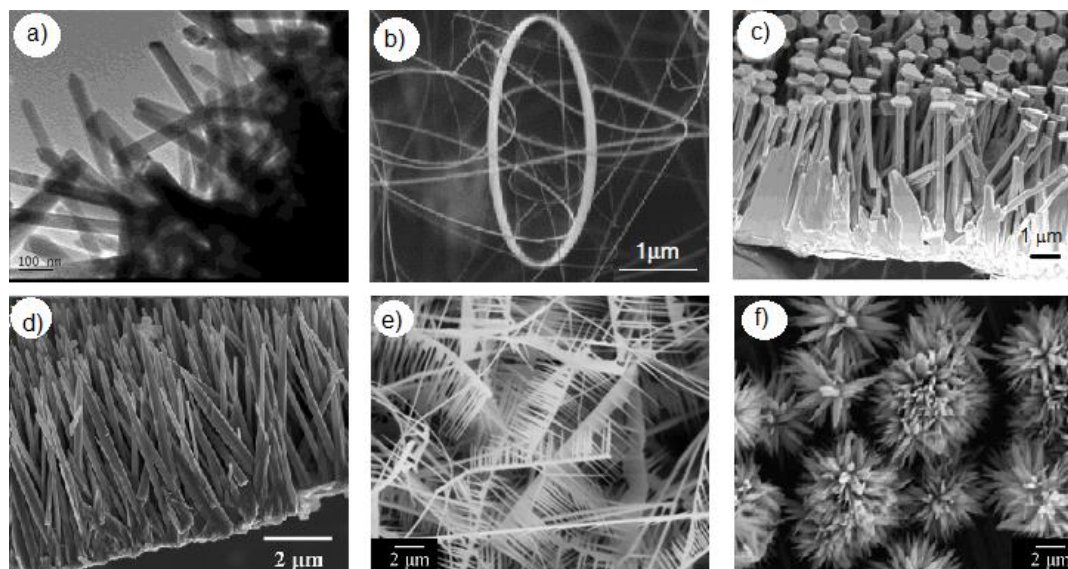


Figura 6 - Exemplos de diferentes tipos de nanoestruturas de óxido de zinco: a) nanobastonetes [43] ; b) nanoanéis [44]; c) nanopregos [45] ; d) nanoagulhas [46]; e) nanocasulos [47] ; f) nanoflores [32].

A precipitação química apresenta vantagens comparativamente aos restantes métodos anteriormente enunciados pois tem baixo custo devido ao facto da precipitação poder ocorrer a baixa temperatura (incluindo a temperatura ambiente) e não exigir reagentes relativamente caros nem equipamentos sofisticados ou dispendiosos [38,53].

2.3.1 Citotoxicidade do óxido de zinco

As nanopartículas de óxido de zinco exibem propriedades interessantes como por exemplo a citotoxicidade seletiva relativamente a células cancerosas e bactérias. O óxido de zinco possui uma citotoxicidade que depende da dose usada, sendo aparente a existência de um limiar de cerca de 20 $\mu\text{g/ml}$ a partir do qual os efeitos citotóxicos são notoriamente pronunciados. A variação de tamanho médio de partícula (dentro da escala nanométrica) não altera de forma significativa a capacidade citotóxica [42,54–59].

Um dos mecanismos propostos para explicar a citotoxicidade do óxido de zinco baseia-se na ação das espécies reativas de oxigénio (ROS). A formação das ROS está

geralmente associada a defeitos cristalinos das nanopartículas de ZnO e a reações entre espécies de oxigénio adsorvidas na superfície do material e pares eletrão/lacuna (e^-/h^+). A formação de ROS também pode ser induzida através da radiação ultravioleta (UV). As ROS atacam a membrana celular (principalmente pela peroxidação lipídica), os ácidos nucleicos, e as proteínas (induzindo, por exemplo, a desativação de enzimas) [33,42,60,61].

Na figura 7 encontra-se ilustrado o mecanismo da formação de ROS na presença de óxido de zinco e sob a ação de radiação UV:



Figura 7 - Mecanismo de produção de ROS em presença de ZnO: sob radiação UV são produzidos lacunas (h^+) na banda de valência e eletrões (e^-) na banda de condução, resultando pares e^-/h^+ que originam ROS. Retirado de [60].

2.3.2 Interface ZnO/solução em meio aquoso

A química da superfície dos biomateriais pode ter um impacto significativo nas suas interações biológicas. Devido à sua elevada razão (área superficial/volume), as nanopartículas (NP's) tendem a aglomeram-se e a adsorver proteínas na sua superfície [62].

O óxido de zinco em meio aquoso desenvolve uma dupla camada elétrica que resulta da adsorção de iões ou moléculas na superfície. Esta dupla camada é formada por espécies carregadas positiva e negativamente [63–65]. Na figura 8 encontra-se a dupla camada elétrica formada após imersão de nanopartículas de óxido de zinco em meio aquoso:

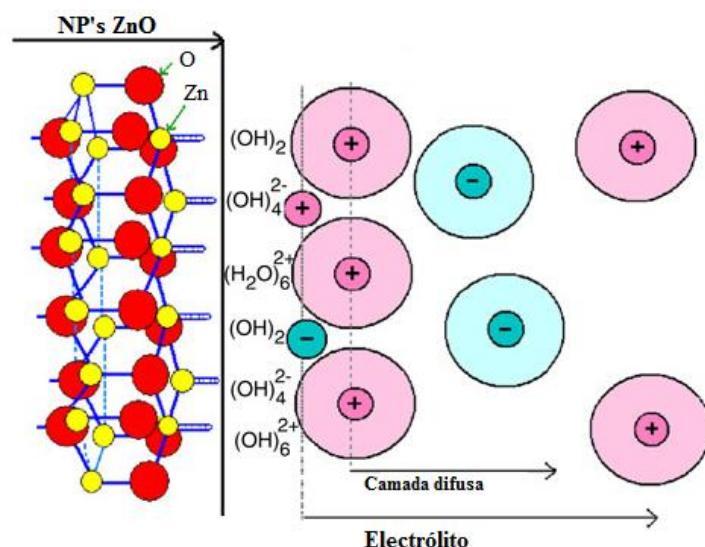
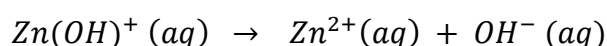
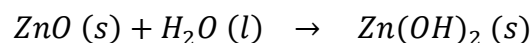
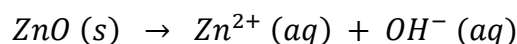


Figura 8 – Esquema da dupla camada elétrica formada na superfície de nanopartículas de óxido de zinco, onde são visíveis as espécies com carga positiva (+) e negativa (-). Adaptado de [66].

Em meio aquoso a dissolução do óxido de zinco pode ocorrer numa gama alargada de valores de pH, como é visível na figura 9. A dissolução do ZnO forma espécies carregadas positiva e negativamente, de acordo com as seguintes reações [67,68]:



Sendo a reação total de dissolução é representada como:



O óxido de zinco interage com as espécies presentes na solução (H^+ , Na^+ , Cl^- , HCO_3^- , por exemplo), podendo adsorvê-las na sua superfície [64,65,69].

A adsorção de aniões (como o HCO_3^-) na interface ZnO/eletrólito leva a uma diminuição do ponto isoelétrico (valor de pH onde uma molécula apresenta carga nula) devido ao aumento da concentração de grupos carregados negativamente (ex. $\text{ZnOH}_2^+\text{HCO}_3^-$

) e a diminuição simultânea de formas iónicas carregadas positivamente (ex. ZnO_2^+) [64,65,69].

A diminuição da concentração de grupos de carga positiva leva à formação de iões de carga negativa e como a carga da camada de difusão é proporcional à soma dos grupos carregados positiva e negativamente, ocorre a diminuição do potencial zeta. O potencial zeta define-se como a carga superficial que uma partícula em solução adquire devido aos grupos iónicos formados na sua superfície [64,65,69].

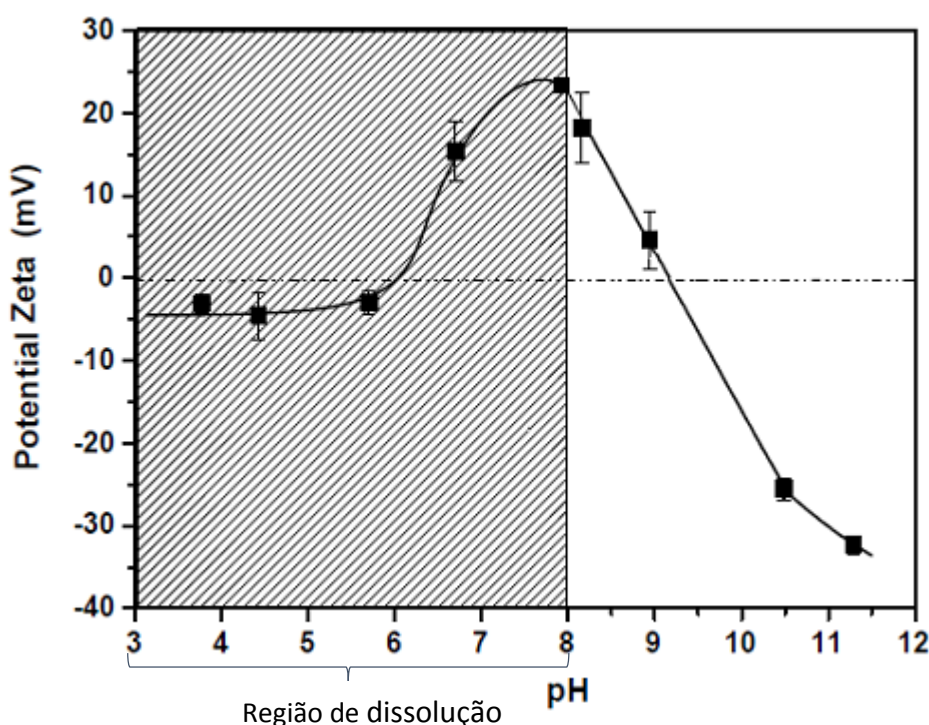


Figura 9 – Variação do potencial zeta em meio aquoso de nanopartículas de óxido de zinco em função do pH, incluindo a região para a qual o ZnO sofre dissolução. Adaptado de [70].

2.3.3 O óxido de zinco e a bioatividade

Existem alguns estudos sobre a bioatividade de nanopartículas, como é o caso da sílica [71]. Não foram, no entanto, reportados estudos de bioatividade em nanopartículas óxido de zinco mas antes a influência da presença do zinco, sob a forma iónica ou elementar, no comportamento bioativo de cerâmicos (vidros bioativos, vidros cerâmicos bioativos e fosfatos de cálcio).

A literatura não é consensual na medida em que consoante o cerâmico em questão, a adição de zinco pode aumentar ou diminuir a capacidade bioativa.

A adição de zinco tem sido proposta para reduzir a alta solubilidade dos vidros bioativos convencionais e aumentar a sua osteocondutividade. Os vidros bioativos que possuem zinco na sua constituição têm sido reportados como possuindo maior durabilidade em solução aquosa do que os isentos de zinco [72,73].

Lusvardiet al. [74] reportaram que a presença de zinco aumenta a durabilidade dos vidros à base de fosfosilicatos, retardando a degradação do vidro em SBF, o que foi especialmente evidente para concentrações mais elevadas de zinco. É de frisar que a adição de zinco não impediu a formação da camada de hidroxiapatite na superfície do vidro. Nos testes *in vivo* verificou-se que a espessura da camada de hidroxiapatite (HA) variou inversamente com o conteúdo de zinco.

Resultados semelhantes foram reportados em estudos *in vitro* em vidros do tipo 58S em vidros cerâmicos do sistema $\text{CaMgSi}_2\text{O}_6\text{--CaSiO}_3\text{--Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F--Na}_2\text{SiO}_3$, por Duet al. [75] e por Salman et al. [76] sugerindo-se que tanto o Zn^{2+} no vidro como na solução retardam a deposição de hidroxiapatite.

Contrariamente, Bini et al. [77] observaram um aumento da capacidade bioativa em vidros e vidros cerâmicos do tipo $\text{SiO}_2\text{--P}_2\text{O}_5\text{--CaO}$ com a adição de zinco. Notavelmente, até a adição de zinco em pequenas quantidades (cerca de 0,4% em peso) promoveu a formação da camada de hidroxiapatite.

Alguns autores atribuem o retardamento da formação da camada de HA ao facto do fosfato de zinco ($\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2$) apresentar uma constante de solubilidade significativamente inferior á do fosfato de cálcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), o que origina uma precipitação preferencial $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2$, causando uma diminuição da velocidade de nucleação de HA [75,78].

A análise da literatura indica que são necessários mais estudos para quantificar corretamente a influência da dopagem de zinco nos processos de dissolução dos vidros bioativos de modo a controlar a libertação iónica e a desempenho biológico [28].

Foram também observados efeitos benéficos da adição de zinco em cimentos ósseos contendo β -TCP, designadamente no aumento da proliferação de osteoblastos humanos [79]. Resultados similares foram obtidos também em compósitos de HA/ZnO [80].

2.4 Compósitos PU/ZnO

Os compósitos são frequentemente constituídos por duas fases: uma fase contínua (matriz), que envolve a denominada fase dispersa. As propriedades dos compósitos são fortemente influenciadas pelas propriedades dos seus constituintes, a sua distribuição e a interação entre eles e também pelas propriedades da fase dispersa (forma, tamanho e distribuição) [6].

Como foi referido no capítulo I, mostrou-se que era possível controlar a bioatividade e citotoxicidade de compósitos de PU/ZnO manipulando a morfologia das nanopartículas de óxido de zinco (e a sua percentagem em peso) empregues na preparação dos compósitos. Os resultados demonstraram que alterando a razão polímero/nanopartículas, os compósitos resultantes (2% e 50% em peso de nanopartículas de ZnO) revelaram diferentes potencialidades de aplicação na indústria biomédica. Os compósitos com 50% em peso apresentaram maior potencial bioativo em meio celular (SBF) e citotoxicidade elevada em linhas celulares MC3T3, enquanto os com 2% em peso originaram uma viabilidade celular mais elevada e capacidade bioativa inferior. Assim, pode-se inferir que para aplicações ortopédicas os compósitos com 2% em peso seriam os mais adequados (devido à viabilidade celular elevada) e que os de 50% em peso para aplicações em que se pretende travar a proliferação celular, como no tratamento do cancro (compósitos com 50% em peso) [4].

Na literatura são raros outros exemplos de compósitos de PU/ZnO, referindo-se no entanto compósitos com outra matriz como o quitosano [49] ou o policloreto de vinil (PVC) [81]. Foram reportados compósitos de poliuretano com cerâmicos (como vidros bioativos [82] e hidroxiapatite [83]) nos quais se confirmou que os cerâmicos conferiam bioatividade aos compósitos e que o poliuretano possuía um comportamento inerte.

Os escassos estudos em compósitos PU/ZnO evidenciam comportamentos interessantes em medicina regenerativa:

Seil e Webster [84] propõem um compósito para facilitar a regeneração *in vitro* de células do sistema nervoso central tendo em conta as propriedades piezoelétricas do ZnO. Verificou-se que os compósitos diminuíam a adesão e proliferação de astrócitos. Apesar dos astrócitos desempenharem funções essenciais para o sistema nervoso central (SNC), como nutrição e sustentação dos neurónios, regulação de neurotransmissores e da concentração de diversas substâncias com potencial para interferir nas funções neuronais normais, a sua proliferação excessiva é um dos fatores que prejudica a regeneração do SNC [3].

Anma et al [85] produziram uma matriz de nanofibras de compósitos PU/ZnO através de *electrospinning*. Os resultados demonstraram que as nanofibras de compósitos PU/ZnO, comparativamente com as de poliuretano, possuíam um efeito benéfico na adesão, diferenciação e proliferação celular em osteoblastos de ratos, reiterando a possibilidade de aplicação na área de engenharia de tecidos.

2.5 Poliuretano

Desde que o poliuretano (PU) foi sintetizado pela primeira vez em 1937 por Otto Bayer, tem sido usado numa variedade de aplicações designadamente na fabricação de elastómeros, espumas, tintas e adesivos. No entanto, só na década de 60 é que os poliuretanos começaram a ser aplicados na indústria biomédica, sendo atualmente empregues na produção de válvulas cardíacas, sacos para armazenamento de sangue, membranas de diálise, próteses, adesivos ósseos, fios de sutura, *stents* e sistemas de libertação de fármacos [86–90].

Os poliuretanos formam uma grande família de materiais poliméricos segmentados com uma enorme diversidade de composições químicas e propriedades, podendo ser usados na indústria biomédica devido ao seu fácil processamento e biocompatibilidade [86–88,91].

O *Biomer*® foi o primeiro poliuretano usado para aplicações cardiovasculares devido às suas boas propriedades mecânicas e biocompatibilidade, enquanto o *Pellethane*® surgiu como componente para *pacemakers*. Contudo começou a verificar-se que o poliuretano tendia a degradar-se podendo causar problemas nos implantes. [90]

Atualmente é comercializado para aplicações médicas com as denominações comerciais de *AbioCor*®, *Cardiothene*®, *Chronoflex*®, *Hemothane*®, *Mitrathane*®, *Surethane*® e *Tecoflex*® [87,88].

A grande diversidade de aplicações do poliuretano deve-se ao facto da sua composição química poder ser alterada, quer pela escolha de diferentes matérias-primas quer pelas condições de processamento, para responder a requisitos específicos [88].

Quimicamente, os poliuretanos são formados a partir de três componentes básicos: um poliól (segmento flexível da cadeia), um isocianato e um extensor de cadeia (sendo estes dois últimos o segmento rígido do polímero). O PU forma-se por reação de um isocianato com um poliól resultando num grupo uretano.

Na figura 10 ilustra-se a reação de formação do grupo uretano do poliuretano:

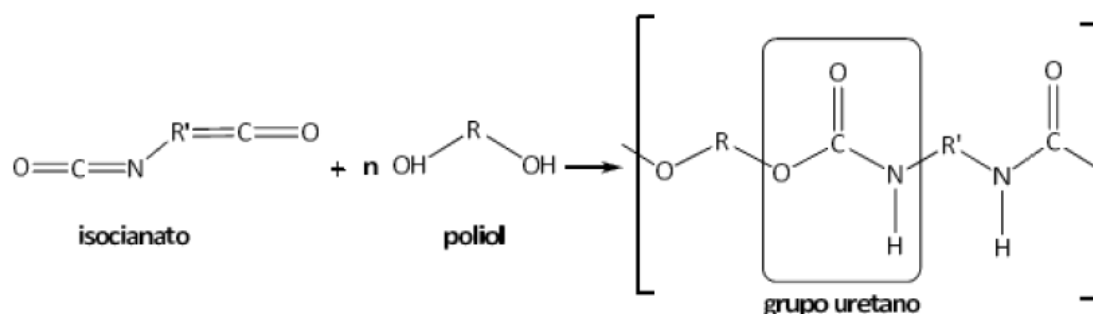


Figura 10 - Formação do grupo uretano do PU através de reação química entre um poliól (OH-R-OH) e um diisocianato (O=C=R=C=O). Retirado de [91].

No entanto, a reação direta entre um poliól e um diisocianato resulta num PU de baixa resistência mecânica. De modo a contrariar este facto utiliza-se um extensor de cadeia (geralmente uma pequena molécula cujos grupos terminais podem ser hidroxilo ou amina) O extensor de cadeia reagem com o diisocianato formando o segmento rígido do poliuretano [87,88,91].

Os poliuretanos típicos podem ser representados pela seguinte fórmula:

$$P - (D(CD)_n - P)_n$$

onde “P” corresponde ao poliól, “D” ao diisocianato e “C” ao extensor de cadeia.

Capítulo III

3 Procedimento experimental

No presente capítulo são descritos os procedimentos e as técnicas usadas durante a parte experimental deste trabalho. Nas primeiras secções serão referidos os materiais e reagentes utilizados ao longo de todo o trabalho e os procedimentos usados para a síntese de nanopartículas de óxido de zinco e produção de compósitos de poliuretano e óxido de zinco. Na secção seguinte refere-se o procedimento experimental escolhido para conduzir os estudos de bioatividade. Por fim, encontra-se uma breve descrição das variadas técnicas de caracterização utilizadas ao longo do trabalho.

3.1 Materiais e reagentes utilizados

Na tabela 4 encontram-se os materiais e reagentes usados na produção das nanoestruturas e compósitos, juntamente com a respetiva fórmula química, empresa fornecedora e grau de pureza (quando este se encontra disponível):

Tabela 4 - Materiais e reagentes utilizados na síntese das nanopartículas de óxido de zinco e na produção dos compósitos (incluindo a sua fórmula química, empresa fornecedora e grau de pureza).

| Reagente | Fórmula química | Fornecedor | Pureza |
|--|------------------------|-----------------|---------------|
| 1,2 – Dicloroetano | $C_2H_4Cl_2$ | Fluka | $\geq 99,5\%$ |
| 2 – Propanol | C_3H_8O | Fluka | $> 99,8\%$ |
| Ácido cítrico monoidratado | $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ | Sigma - Aldrich | 99,5 – 102% |
| Cloreto de Zinco | $ZnCl_2$ | Merck | $\geq 98\%$ |
| Clorofórmio | $CHCl_3$ | Carlo Erba | $\geq 99\%$ |
| Etanol | C_2H_5OH | Carlo Erba | $\geq 99,9\%$ |
| Hidróxido de Sódio | $NaOH$ | Sigma - Aldrich | $\geq 98\%$ |
| Nanopartículas Comerciais de Óxido de Zinco | ZnO | Aldrich | — |
| Poliuretano | PU | Fluka | — |

3.2 Síntese das nanoestruturas de óxido de zinco

As nanoestruturas de óxido de zinco foram sintetizadas a partir do método da precipitação química à temperatura ambiente conforme descrito na literatura [92] e devidamente adaptado à produção de nanopartículas em trabalhos anteriormente realizados no Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica da Universidade de Aveiro [4,38].

O método empregue consiste na adição de soluções básicas (à base de hidróxido de sódio) a uma solução ácida (contendo iões zinco) com o auxílio de um pulverizador (figura 11). O produto resultante é constituído por nanopartículas de óxido de zinco sob a forma de um precipitado branco.

Na figura 12 encontra-se esquematizado o procedimento experimental para a síntese de nanopartículas de óxido de zinco.

Para efetuar a adição das soluções básicas utilizou-se um pulverizador (sendo o caudal admitido de 41,6 ml/min). O pulverizador possui dois orifícios: um superior (S) e um lateral (L). As soluções básicas são adicionadas pelo orifício superior e, ao entrarem em contato com o ar comprimido (a uma pressão de aproximadamente 3 bar) admitido pelo orifício lateral, sofrem uma dispersão e dão origem a pequenas gotículas que vertem para a solução ácida.

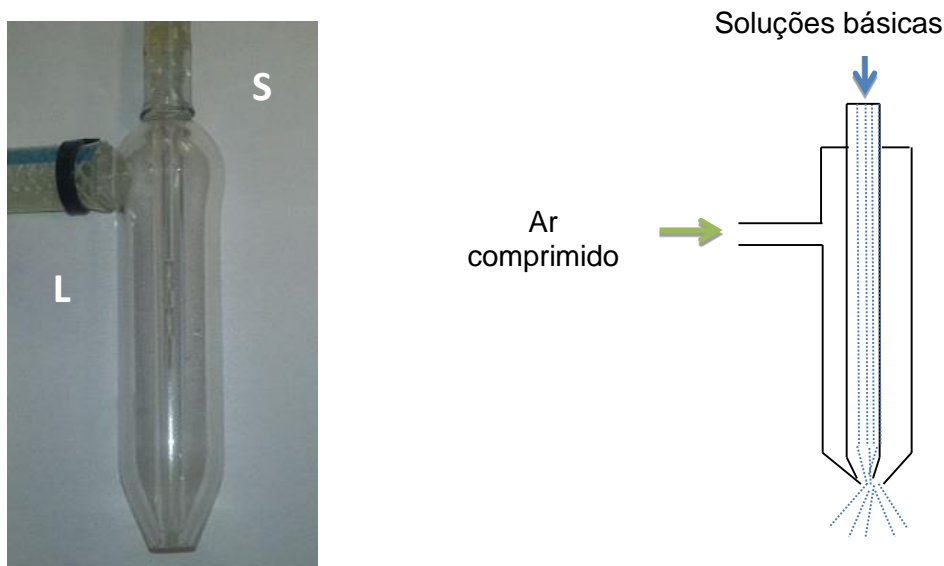


Figura 11 – Fotografia do pulverizador usado no procedimento experimental (esquerda); Esquema ilustrativo do pulverizador evidenciando o seu princípio de funcionamento (direita).

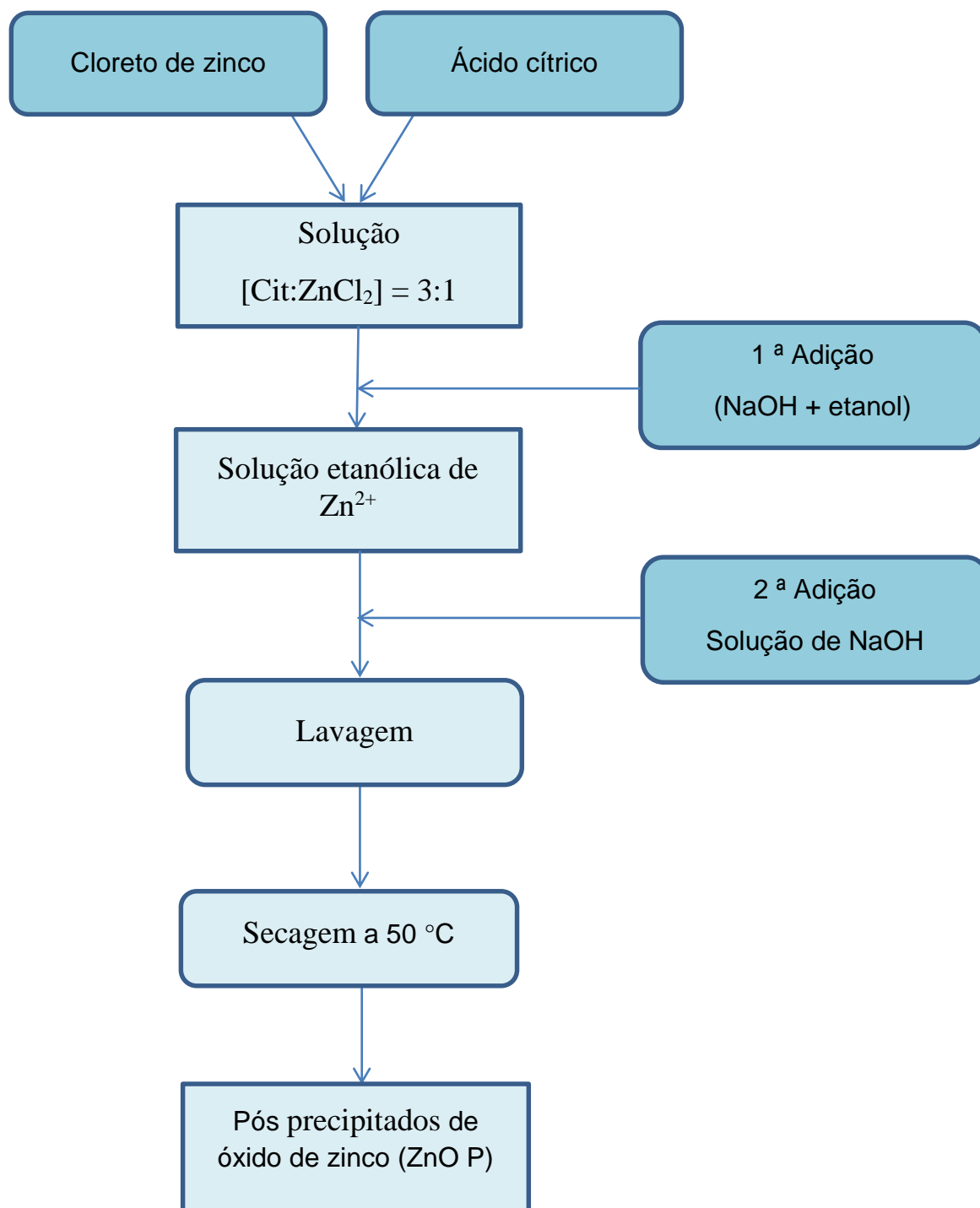


Figura 12 – Esquema do procedimento experimental usado na síntese dos pós de óxido de zinco.

De modo a preparar a solução ácida de Zn^{2+} , procedeu-se à dissolução de 17 gramas de ácido cítrico e 3,674 gramas cloreto de zinco em 25 mililitros de água destilada sob agitação magnética. A solução em questão apresentou uma fração molar de 3:1 (de modo a garantir a complexação dos iões Zn^{2+}), um pH de 1 e uma concentração de iões Zn^{2+} de 1,89 mmol/ml.

De seguida adicionou-se a solução etanólica de NaOH (1ª adição) e posteriormente 15 mililitros de NaOH (2ª adição). Após as adições formou-se um precipitado branco (óxido de zinco). A solução final apresentou um pH de 13,5.

O precipitado resultante foi centrifugado e o depósito resultante foi lavado 12 vezes em água desionizada assegurando-se uma concentração de Na^+ na última lavagem de aproximadamente 1 ppm.

Finalmente, o depósito resultante das lavagens foi seco numa estufa a 50° C durante um período não inferior a 24 horas.

Os pós produzidos pelo método descrito anteriormente (ZnO P) e o pó comercial (ZnO C) foram caracterizadas por difração de raios-X (DRX), microscopia eletrónica de varrimento (SEM) com espetrometria de energia dispersiva (EDS) e espetroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). Adicionalmente caracterizou-se a distribuição granulométrica e determinou-se a área superficial específica (ASE) através de isotérmicas de *Braunauer-Emmett-Teller* (BET).

Para se observar o interior das nanopartículas de óxido de zinco precipitado (ZnO P) no microscópio eletrónico de varrimento (SEM), preparou-se uma pastilha (através de prensagem unidirecional com carga de 1000 Kg) tendo sido depois embebida em cola *M-Bond 610* e sujeita a um aquecimento a 800 ° C durante duas horas (para secar a cola). Após a secagem, a superfície da pastilha foi desgastada com o auxílio de papel abrasivo *Stuers* e pasta de diamante *Amplex*.

3.3 Preparação dos compósitos PU/ZnO

Os compósitos foram preparados através do método de evaporação de solvente. As percentagens do solvente (clorofórmio) e óxido de zinco foram alteradas de modo a produzir compósitos com diferentes percentagens em peso de ZnO (2%, 10% e 50% em peso de ZnO).

Dissolveu-se o poliuretano em clorofórmio (2,47 % de peso PU) sob agitação magnética. Preparou-se uma suspensão de nanopartículas de óxido de zinco em 1,2 – dicloroetano através de ultrassons durante 5 minutos. A solução de PU dissolvido em clorofórmio e a suspensão de nanopartículas foram misturadas com agitação de ultrassons durante 10 minutos. A mistura final foi colocada em copos de 10 ml numa estufa a 37°C, durante um período superior a 12 horas de modo a evaporar totalmente os solventes (clorofórmio e 1,2 – dicloroetano). Na figura 13 encontra-se esquematizado o procedimento experimental adotado para a produção das membranas dos compósitos de PU/ZnO.

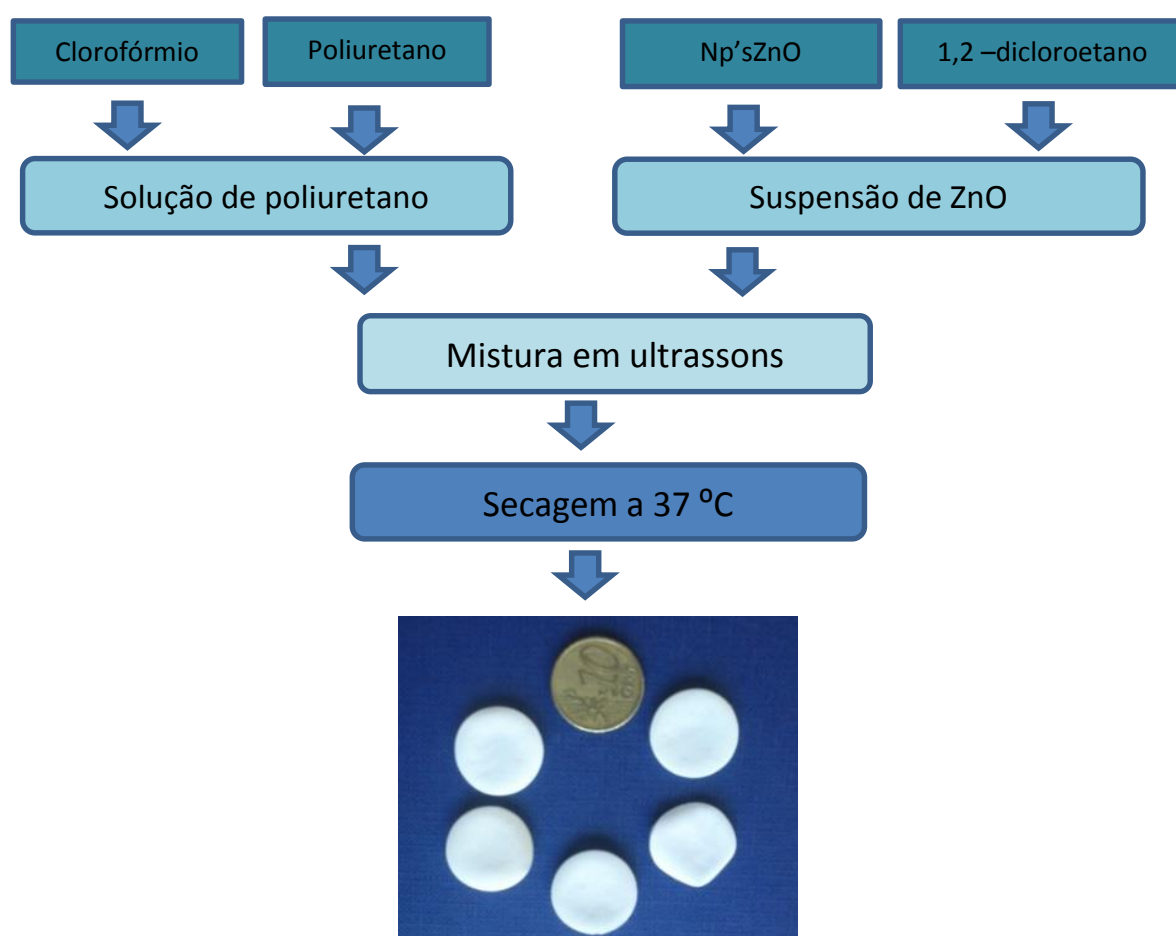


Figura 13 - Esquema ilustrativo da preparação de compósitos de PU/ZnO. O tamanho das membranas obtidas é comparado com uma moeda de 0,10 €.

Para efeitos de comparação prepararam-se filmes de poliuretano puro (C0). Procedeu-se à dissolução de PU em clorofórmio (2,47 % em peso de PU) sob agitação magnética. A solução de PU dissolvido foi submetida a ultrassons durante 10 minutos e, tal como como nos compósitos, procedeu-se à sua secagem numa estufa a 37° C em copos de 10 ml, durante um período superior a 12 horas.

De modo a facilitar a distinção entre os vários tipos de compósitos e filmes de poliuretano preparados, estes foram denominados consoante a proveniência dos materiais utilizados na sua preparação e percentagem em peso de óxido de zinco. A denominação adotada é apresentada na tabela 5:

Tabela 5 - Denominação dos materiais preparados com base na proveniência do óxido de zinco usado na sua síntese e na respetiva percentagem em peso no compósito.

| Denominação dos materiais preparados | Óxido de zinco usado | Percentagem em peso de óxido de zinco |
|--------------------------------------|----------------------|---------------------------------------|
| CP2 | Precipitado (ZnO P) | 2% |
| CP10 | | 10% |
| CP50 | | 50% |
| CC2 | Comercial (ZnO C) | 2% |
| CC10 | | 10% |
| CC50 | | 50% |
| C0 | - | 0% |

3.4 Estudos de bioatividade

Tal como foi referido no capítulo II, a avaliação da bioatividade *in vitro* de um material é feita através de testes de imersão em SBF (*Simulated Body Fluid*). A solução de SBF foi preparada de acordo com o proposto por Kokubo e Takadama. [10]. Os reagentes utilizados para a preparação de SBF foram os indicados na tabela 6 (por ordem de introdução em água desionizada, para 1 litro de SBF):

Tabela 6 – Ordem de adição, fórmula química e quantidade dos reagentes utilizados na preparação de 1 litros de SBF.

| Ordem | Reagente | Fórmula química | Quantidade |
|-------|-----------------------------------|--|------------|
| 1 | Cloreto de sódio | NaCl | 7,996 mg |
| 2 | Bicarbonato de sódio | NaHCO ₃ | 0,350 mg |
| 3 | Cloreto de potássio | KCl | 0,224 mg |
| 4 | Fosfato de potássio tridratado | K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O | 0,228 mg |
| 5 | Cloreto de magnésio | MgCl ₂ ·6H ₂ O | 0,305 mg |
| 6 | Ácido clorídrico | HCl | 40 ml |
| 7 | Cloreto de cálcio | CaCl ₂ ·6H ₂ O | 0,548 mg |
| 8 | Sulfato de sódio | Na ₂ SO ₄ | 0,071 mg |
| 9 | Tris (hidroximetil) – aminometano | NH ₂ C(CH ₂ OH) ₃ | 6,057 mg |

A adição de cerca de 80% da quantidade de ácido clorídrico foi efetuada antes da adição dos sais de magnésio e de cálcio de modo a impedir a precipitação de fosfatos destes cations, baixando significativamente o pH da solução. Após a adição de Tris (hidroximetil) – aminometano (reagente 9), o pH aumentou para cerca de 8, adicionando-se então o restante ácido clorídrico para ajustar o valor de pH para valores próximos do pH normal do plasma humano (7,2 - 7,4).

O volume de SBF recomendado [10] para um ensaio de bioatividade deverá ser maior que o volume de solução calculado - V_s (ml), onde Sa é a área superficial específica (mm²):

$$V_s = \frac{Sa}{10}$$

3.4.1 Pós de óxido de zinco

De modo a avaliar a capacidade bioativa dos pós de óxido de zinco, usou-se uma membrana de diálise (12-14000 Daltons, *Medicell International Ltd*) como suporte dos pós durante as imersões, permitindo a sua fácil remoção findos os tempos de imersão. Para cada tempo de imersão, transferiram-se 15 miligramas de nanopartículas de ZnO (juntamente com 5ml de SBF) para uma membrana de diálise sendo o conjunto imerso em SBF em copos previamente esterilizados com o auxílio de radiação UV (figura 14). Os frascos foram então colocados numa estufa a 37 °C, e após 1, 3, 7, 14 e 21 dias foram retirados os pós e reservadas

amostras de SBF que se guardaram no frigorífico para posterior análise por ICP (*Inductively Coupled Plasma*) das concentrações iónicas de alguns elementos (cálcio, fósforo e zinco) presentes na solução.

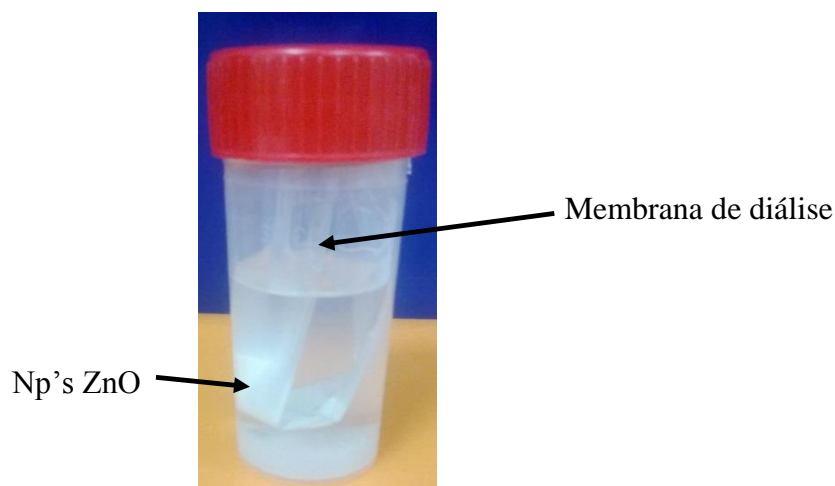


Figura 14 - Esquema experimental adotado para os estudos de bioatividade das nanopartículas de ZnO.

Antes de serem usadas, as membranas de diálise necessitam de um tratamento de limpeza prévio para remover a glicerina protetora presente na sua superfície das membranas. O tratamento decorreu de acordo com as especificações do fornecedor [93]: as membranas foram colocadas num recipiente contendo solução aquosa com 2 % de bicarbonato de sódio e 1 milimolar de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) a 80° C durante 30 minutos. Após o aquecimento, o interior das membranas foi lavado com água ultrapura à temperatura ambiente de modo a remover quaisquer vestígios tanto de glicerina como dos produtos usados no tratamento.

3.4.2 Bioatividade de compósitos PU/ZnO

Para cada tempo de imersão, colocou-se a amostra do compósito num copo previamente esterilizado através de radiação UV. Os frascos foram então colocados numa estufa a 37 °C, tendo sido recolhidos após 1, 3, 7, 14 e 21 dias. Este procedimento foi repetido para cada tipo de compósito e para os filmes de poliuretano puro (C0).

Tal como no procedimento de imersão dos pós em SBF, foram reservadas amostras de SBF no frigorífico para posterior análise por ICP (*Inductively Coupled Plasma*) das concentrações iónicas de alguns elementos (Ca, P e Zn) presentes na solução.

Decorridos e respetivos tempos de imersão, os pós e os compósitos PU/ZnO foram analisados por difração de raios-X (DRX), microscopia eletrónica de varrimento (SEM) com espectrometria de energia dispersiva (EDS) e espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).

3.5 Técnicas de caracterização

3.5.1 Difração de Raio-X

A difração de raio-X permite a identificação das fases cristalinas em materiais cristalinos. A análise foi efetuada num difratómetro *Rigaku Geigerflex D/Max-SérieC*, com uma corrente de 30mA, uma voltagem de 40KV e usando uma radiação emitida $K\alpha$ ($\lambda=1,54056 \text{ \AA}$). A análise de difração de raio-X foi usada para identificar as fases cristalinas nos pós (precipitado e comercial), no poliuretano, nos compósitos e para calcular o tamanho de cristalite (TC) nas partículas de óxido de zinco.

O tamanho de cristalite “TC” pode ser calculado a partir de um difratograma usando a equação de *Debye-Scherrer*:

$$TC = \frac{K\lambda}{\beta \cos \theta}$$

onde “K” é o fator de forma (0.98 para superfícies esféricas); “ λ ” o comprimento de onda do raio-X (normalmente $1,54056 \text{ \AA}$); “ θ ” o ângulo em radianos onde ocorre a difração, sendo “ β ” definido por:

$$\beta = \sqrt{(A_{obs}^2 - a^2)}$$

onde A_{obs} é a largura a meia altura do pico ou FWHM (*full-width at half maximum*) da amostra analisar e a refere-se a FWHM da amostra padrão (quartzo).

3.5.2 Microscopia eletrónica de varrimento (SEM)

As amostras foram observadas através de um microscópio eletrónico de varrimento *Hitachi modelo S-4100*.

De modo a se proceder á observação dos pós de óxido de zinco depositaram-se duas gotas de suspensão de pó (10 mg/10 ml de 2-propanol) numa lamela, previamente fixa com cola de carbono (*Neubauer Chemikalien*) a um porta-amostra de alumínio plano e polido. As medições de diâmetro das nanopartículas e subunidades foram efetuadas através do software *Image J*, tendo sido feitas 20 medições em nanopartículas distintas em diferentes regiões da amostra após observação ao microscópio eletrónico de varrimento. Os compósitos e a pastilha de nanopartículas foram fixos em fita de carbono nos porta amostras.

Todas as amostras foram sujeitas a uma deposição de um filme fino de carbono, num equipamento *Emitech K950*.

3.5.3 Adsorção gasosa para determinação de área superficial específica

Chama-se isotérmica de adsorção à relação, à temperatura constante, entre a quantidade de gás adsorvido na superfície do material e a pressão parcial em que ocorre. É normalmente representada como a quantidade adsorvida em função da pressão relativa (p/p^0), em que p^0 é a pressão de saturação da substância adsorvida à temperatura do ensaio.

Segundo a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), as isotérmicas de adsorção são classificadas em seis tipos diferentes, estando cada tipo de isotérmica associado a um determinado mecanismo de adsorção [94].

A classificação usada atualmente encontra-se ilustrada na figura 15:

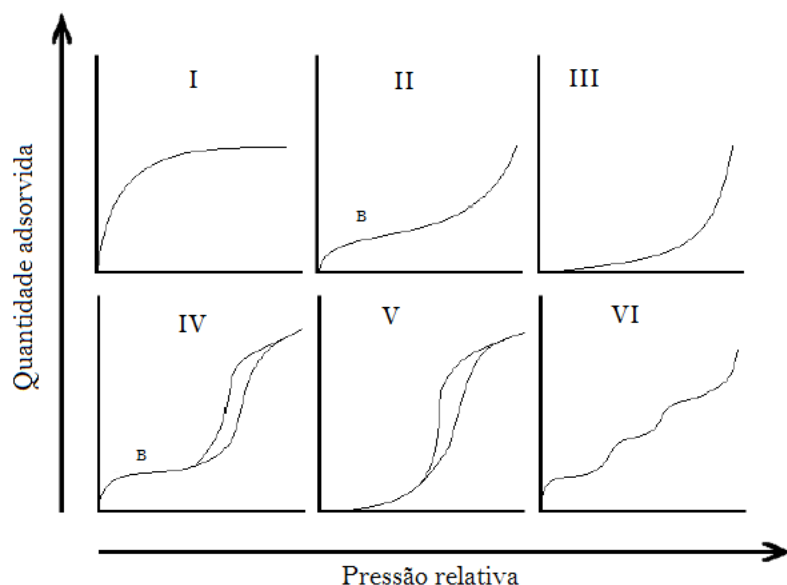


Figura 15 - Classificação IUPAC dos vários tipos de isotérmicas de adsorção de gases. Adaptado de [94].

- ❖ Tipo I – A isotérmica do Tipo I (também conhecida por isotérmica de Langmuir) é característica de sólidos microporosos com baixa superfície externa. Apresenta um patamar correspondente ao preenchimento dos microporos.
- ❖ Tipo II – Está associada a materiais não porosos onde o ponto B corresponde à formação de monocamada.
- ❖ Tipo III – Este tipo de isotérmica não é comum e está associado a uma adsorção energética mais baixa que o tipo II.
- ❖ Tipo IV – Apresentada por materiais mesoporosos.
- ❖ Tipo V – Ocorre em materiais micro e mesoporosos, nos quais a adsorção é baseada numa fraca interação gás/sólido.
- ❖ Tipo VI – Está associada a superfícies uniformes não porosas e traduz um mecanismo de adsorção em multicamada.

O fenómeno de histerese presente nos tipos IV e V pode assumir quatro formas características distintas ilustradas na figura 16:

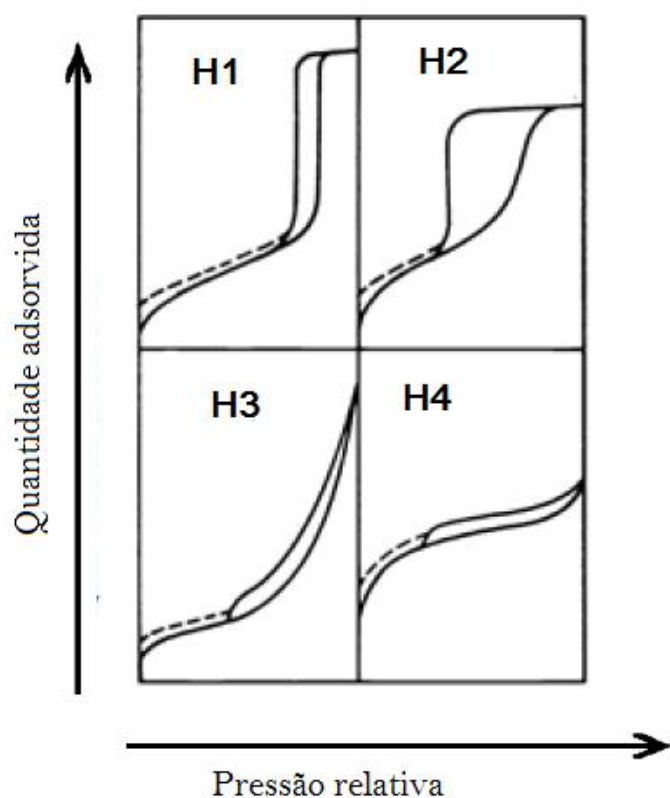


Figura 16 - Classificação IUPAC dos ciclos de histerese (processos de adsorção/dessorção irreversíveis). Adaptado de [94].

- ❖ Tipo H1 – Presente em materiais porosos constituídos por partículas esféricas com aglomerados rígidos.
- ❖ Tipo H2 – Associada a vários mecanismos de condensação e adsorção em materiais que possuem poros em forma de gargalo (“*bottleneck*”).
- ❖ Tipo H3 – Esta forma de histerese ocorre em materiais que possuem uma forma semelhante a uma placa, originam poros sob a forma de fenda.
- ❖ Tipo H4 – Característica de materiais com poros estreitos em fenda.

Consoante o seu diâmetro (D_p), os poros podem ser agrupados (segundo a classificação IUPAC) em 3 grupos distintos:

- Microporos: $D_p < 0,2 \text{ nm}$
- Mesoporos: $0,2 \text{ nm} < D_p < 50 \text{ nm}$
- Macroporos: $D_p > 50 \text{ nm}$

Modelo de Brunauer, Emmett e Teller (BET)

De acordo com o modelo BET, a área superficial específica pode ser determinada a partir da parte linear da isotérmica de adsorção apenas para valores de p/p^0 entre 0,05 e 0,30. Para valores superiores, a equação BET dará valores incorretos. Na sua forma linear, a equação de BET é a dada por:

$$\frac{\frac{p}{p^0}}{n^{ads}(1 - \frac{p}{p^0})} = \frac{1}{n_m^a c} + \frac{c - 1}{n_m^a c} \frac{p}{p^0}$$

em que p corresponde á pressão de equilíbrio, p^0 é a pressão de saturação à temperatura de adsorção, n^{ads} a quantidade adsorvida à pressão p e n_m^a é a quantidade adsorvida necessária para preencher totalmente a monocamada. O parâmetro c é designado por constante de BET é dado por:

$$c = e^{(E_1 - E_L)/RT}$$

onde E_1 e E_L representam respetivamente o calor de adsorção relativa na primeira camada e o calor de condensação de vapor. Na representação linear dos dados experimentais, segundo uma equação do tipo:

$$y = mx + b$$

m e b correspondem a:

$$m = \frac{\frac{p}{p^0}}{n \left(1 - \frac{p}{p^0}\right)} \quad b = \frac{p}{p^0}$$

Através da equação anterior, é possível determinar o número de moles adsorvidas na monocamada a partir do declive e da ordenada na origem. A área que uma monocamada ocupa na superfície do solido pode ser relacionada com a quantidade adsorvida na monocamada através da equação:

$$ASE = m_m^a N_A a_m$$

sendo N_A o número de Avogadro (aproximadamente $6.022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$) e a_m a área média por uma molécula adsorvida na monocamada.

Através da área superficial específica (ASE) é possível calcular o diâmetro esférico equivalente (DEE):

$$DEE = \frac{6}{ASE \times \rho}$$

em que ρ corresponde á densidade teórica do material, neste caso o óxido de zinco ($5,6 \text{ g/cm}^3$).

As áreas superficiais específicas dos pós de ZnO foram determinadas utilizando um equipamento *Micromeritics_Gemini 2370V5*. Antes da determinação do volume de gás adsorvido, os pós permaneceram em vácuo a 150°C durante 4h.

3.5.4 Espectroscopia de infravermelhos com Transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia de infravermelhos com Transformada de Fourier (FTIR) é um método espectroscópico utilizado para avaliar as ligações químicas no material. Este método analisa as mudanças na intensidade dum feixe de infravermelhos em função do seu comprimento de onda (200 a 4000 cm^{-1}) quando interage com a amostra, sendo que cada pico de intensidade pode ser relacionado com uma ligação química específica. Os espectros foram obtidos num espectrómetro de marca *Bruker*, modelo *Tensor 27*, com uma resolução de 4 cm^{-1} e 64 scans. Estes foram adquiridos na gama dos 4000 a 350 cm^{-1} . As amostras foram analisadas pelo laboratório de análises do departamento de Química da Universidade de Aveiro.

3.5.5 Calorimetria diferencial de varrimento (DSC)

A calorimetria diferencial de varrimento (DSC) é utilizada para estudar o comportamento térmico de um material sob aquecimento ou arrefecimento. Entre os acontecimentos possíveis encontram-se: transformações de fase, transições vítreas e cristalizações, sendo o método baseado na comparação entre o comportamento do material analisado e o de um material de referência que não sofre alterações na gama de temperaturas a que ocorre a análise. As análises de DSC decorreram na Escola Superior Aveiro-Norte da Universidade de Aveiro (Escola Superior de Design, Gestão e Tecnologias da Produção Aveiro Norte) em Oliveira de Azeméis.

3.5.6 Análise de distribuição granulométrica

A análise dos tamanhos de partícula dos pós de ZnO e da sua distribuição granulométrica foi feita num equipamento *Coulter LS Particle Size Analyser 230*. Como os pós comerciais de óxido de zinco se apresentavam muito agregados, foram alvo de duas análises granulométricas numa das quais se usou o desfloculante *Reotan* para tentar contrariar a agregação de partículas.

3.5.7 Espectroscopia de emissão por plasma indutivo (ICP)

A determinação analítica dos vários elementos iónicos (cálcio, fósforo e zinco) presentes em SBF foi efetuada através de espectroscopia de emissão por plasma indutivo (ICP) no Laboratório Central de Análises da Universidade de Aveiro, utilizando um espectrómetro *JobinYvon 70 Plus*.

Capítulo IV

4 Resultados e Discussão

4.1 Caracterização dos materiais

4.1.1 Caracterização das nanoestruturas

Os pós de óxido de zinco, comercial e precipitado, foram caracterizados por técnicas de DRX, SEM, EDS e FTIR. Adicionalmente caracterizou-se a distribuição granulométrica e determinou-se a área superficial específica (ASE) através de isotérmicas de BET.

Na figura 17 encontram-se representados os espectros de difração de raio-X dos pós de óxido de zinco objeto de estudo neste trabalho.

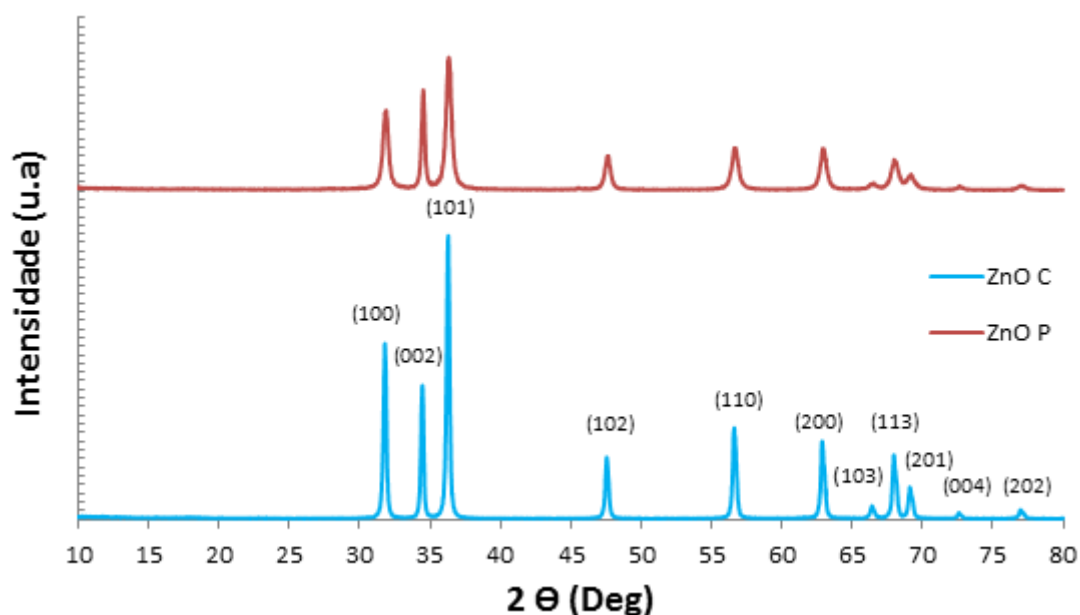


Figura 17 - Difractograma dos pós de óxido de zinco comerciais (ZnO C) e dos sintetizados pelo método da precipitação química (ZnO P).

Os resultados indicam que os pós comerciais (ZnO C) e os precipitados (ZnO P) possuem uma única fase cristalina hexagonal: a wurtzite. Os planos identificados no difratograma da figura 17 coincidem com os planos característicos da wurtzite (segundo a

ficha cristalográfica *JCPDS 00-036-1451* do ZnO), verificando-se a ocorrência de picos estreitos e bem definidos indicativos de elevada cristalinidade.

Calculou-se a razão entre a intensidade dos picos correspondentes aos planos (002) e (101) ($I_{(002)} / I_{(101)}$), tendo-se obtido o valor 0,75 para os pós precipitados e o valor 0,47 para o pó comercial de óxido de zinco sendo estes valores superiores a 0,44, (valor padrão para a razão de intensidade da *wurtzite*), o que indica um crescimento preferencial das partículas precipitadas segundo o eixo (001) [95].

O tamanho de cristalite dos pós em estudo foi calculado através da equação de *Debye-Scherrer*, obtendo-se os valores 42 nm e 87 nm para os pós precipitados e para os pós comerciais, respetivamente. Os pós comerciais apresentam uma maior cristalinidade uma vez que possuem um tamanho de cristalite superior ao dos pós precipitados.

Nas figuras 18 e 19 apresentam-se as micrografias dos pós de óxido de zinco comercial (ZnO C) e dos pós precipitados (ZnO P), respetivamente.

Os pós de ZnO comercial possuem uma estrutura irregular, apresentando variabilidade em tamanho e morfologia. Verifica-se ainda a presença de aglomerados irregulares com variadas morfologias (desde esferas a bastonetes).

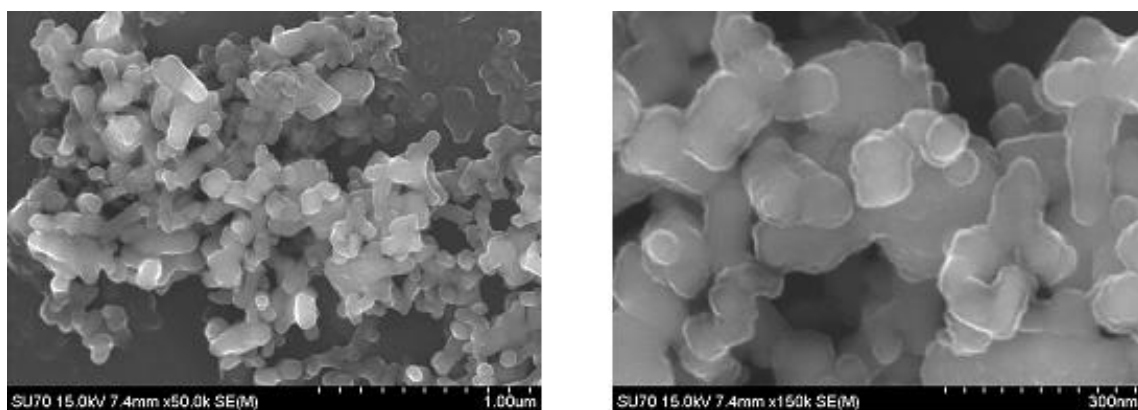


Figura 18 - Micrografias do pó comercial de óxido de zinco (ZnO C) a diferentes ampliações.

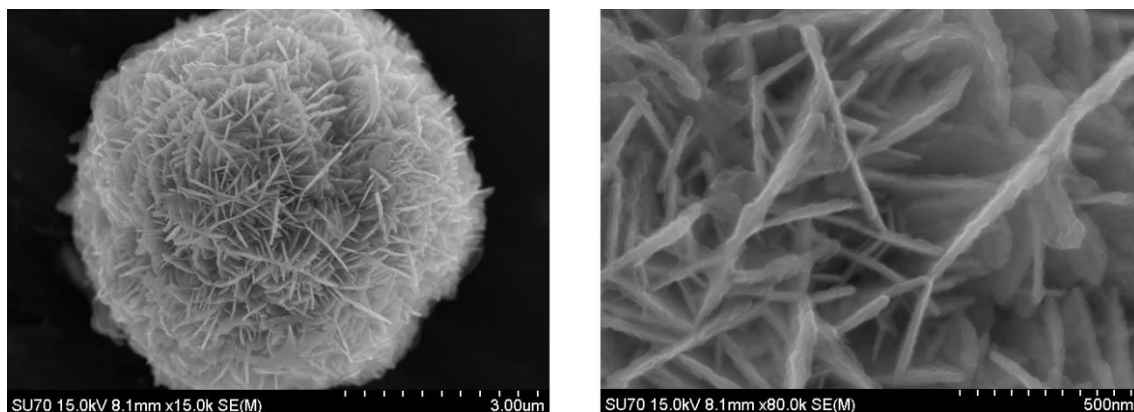


Figura 19 - Micrografias dos pós precipitados de óxido de zinco (ZnO P) a diferentes ampliações.

Os pós precipitados de ZnO apresentam-se com uma morfologia globalmente esférica, bem definida, com cerca de $4,8 \pm 1,1 \mu\text{m}$ de diâmetro, constituída por subunidades nanométricas com forma de placas, cuja espessura média é de aproximadamente 40 nm. A distribuição relativa destas subunidades na partícula esférica torna-a semelhante a uma “nanoflor”. As medições foram realizadas com o programa *Image J* em pelo menos 3 micrografias tiradas em diferentes regiões da amostra.

Na figura 20 apresenta-se uma micrografia de SEM obtida na superfície polida de uma amostra obtida por prensagem das nanoflores. Observa-se que a estrutura mais interior da nanopartícula difere da região externa. De fato as placas nanométricas individualizadas que se identificam na região superficial da nanopartícula dão lugar a um corpo mais denso à medida que se progride para o interior da partícula.

Possivelmente, a variação microestrutural observada resulta das condições de precipitação (pulverizador). Numa fase incipiente da precipitação, quando os núcleos começaram a crescer, o elevado número de partículas com dimensões muito reduzidas e com elevadíssima energia de superfície (devido ao seu tamanho diminuto [39]) poderá ter sofrido agregação. Ocorrendo assim um crescimento por agregação de partículas ou nanoplacas, originando possivelmente uma diminuição progressiva da densidade do interior para o exterior da partícula [38].

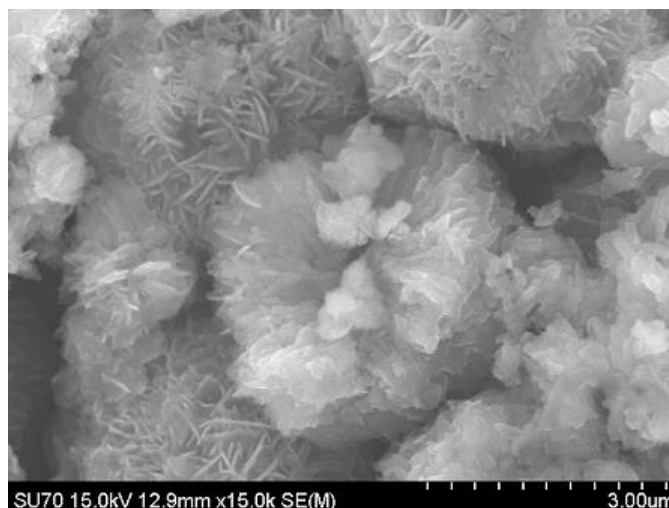


Figura 20 – Micrografia do pó precipitados de óxido de zinco (ZnO P) após desgaste com papel abrasivo e pasta de diamante.

Na figura 21, apresenta-se a análise EDS das partículas de ZnO precipitadas:

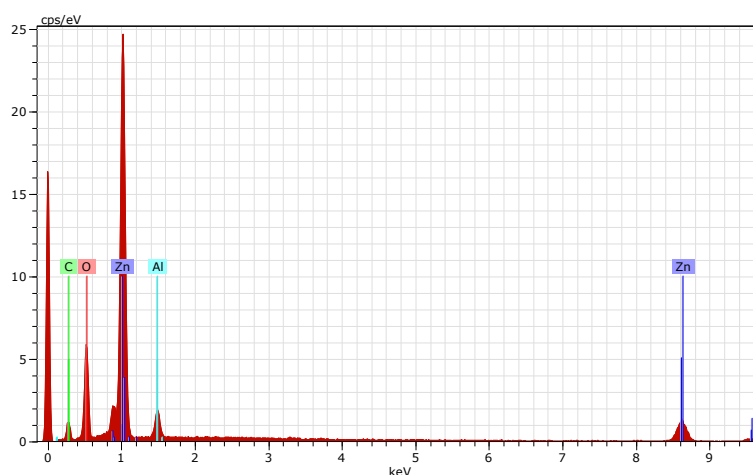


Figura 21 - Espectro de EDS do pó precipitado de óxido de zinco, onde se evidenciam os picos correspondentes aos elementos detetados na amostra: carbono (C), oxigénio (O), zinco (Zn) e alumínio (Al).

Observa-se que além dos picos correspondentes aos elementos de zinco e oxigénio (interpretados como decorrentes da presença de óxido de zinco) apenas se apresentam os picos correspondentes ao carbono (resultante da deposição de carbono para efeitos de observação em SEM) e ao alumínio (presente no porta-amostras). Estes resultados confirmam que o pó de óxido de zinco precipitado é constituído por óxido de zinco puro, não se detetando impurezas mensuráveis.

Observando a distribuição granulométrica dos pós precipitados de óxido de zinco apresentada na figura 22, conclui-se que estes apresentam uma distribuição de tamanhos bimodal em que a larga maioria das nanopartículas apresenta um diâmetro na gama de 4 a 12 μm , cujo valor médio é de 5,528 μm , valor ligeiramente superior às medidas efetuadas por *Image J* (4,8 nm), embora esteja incluído no limite superior da margem de erro das medidas efetuadas.

Corroborando as micrografias de SEM do pó comercial de óxido de zinco, a sua distribuição granulométrica (figura 23) mostra que apesar de possuírem um tamanho de partícula notoriamente mais pequeno que as partículas de óxido de zinco precipitado. As partículas comerciais apresentam maior heterogeneidade de tamanhos com uma distribuição alargada e multimodal. Ao adicionar desfloculante à suspensão de óxido de zinco comercial, verifica-se que a sua distribuição granulométrica se altera, adquirindo picos mais estreitos (indicativo de menor heterogeneidade) e que o seu tamanho médio de partícula diminui (de 1.4 μm para 0.14 μm). Estes resultados estão em linha com as micrografias de SEM, que revelam nanopartículas muito agregadas.

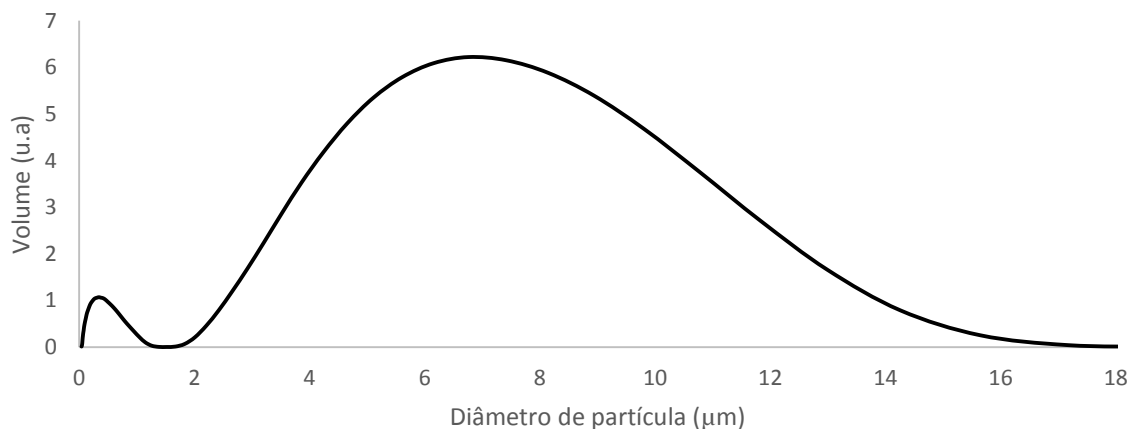


Figura 22 - Distribuição granulométrica dos pós precipitados de óxido de zinco.

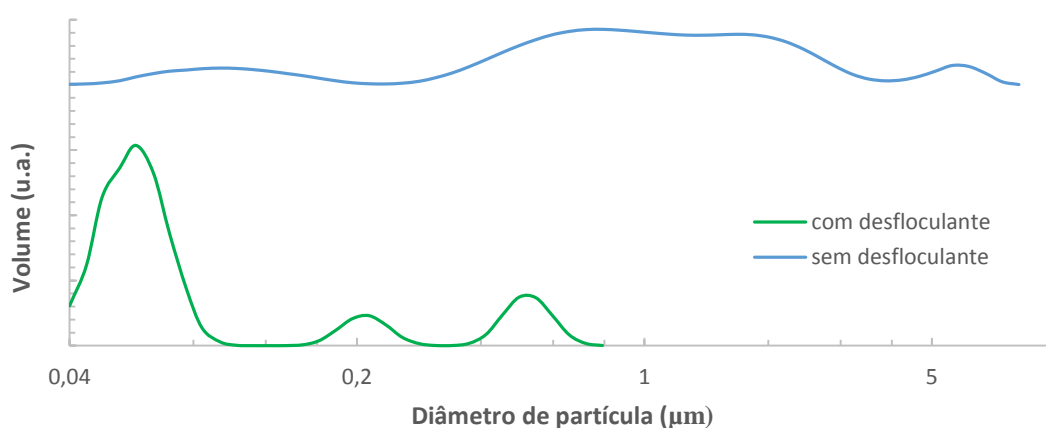


Figura 23 - Distribuição granulométrica do pó comercial de óxido de zinco com e sem desfloculante.

Na figura 24 encontram-se representadas as isotérmicas de adsorção/dessorção dos pós comerciais e dos pós precipitados de ZnO. O pó comercial apresenta uma isotérmica do tipo II característica de materiais não porosos e macroporosos. O pó precipitado possui uma isotérmica do tipo IV, o que indica a presença de mesoporos causadores de condensação capilar mesoporosa. A isotérmica de adsorção/dessorção apresenta uma histerese característica do tipo H3 que é indicativa da presença de poros com a forma de fenda (*slit pore*) [91]. Estes resultados estão de acordo com as micrografias de SEM das nanoflores pois o posicionamento relativo das subunidades com forma de nanoplacas confina com espaços ou poros com a forma de fenda.

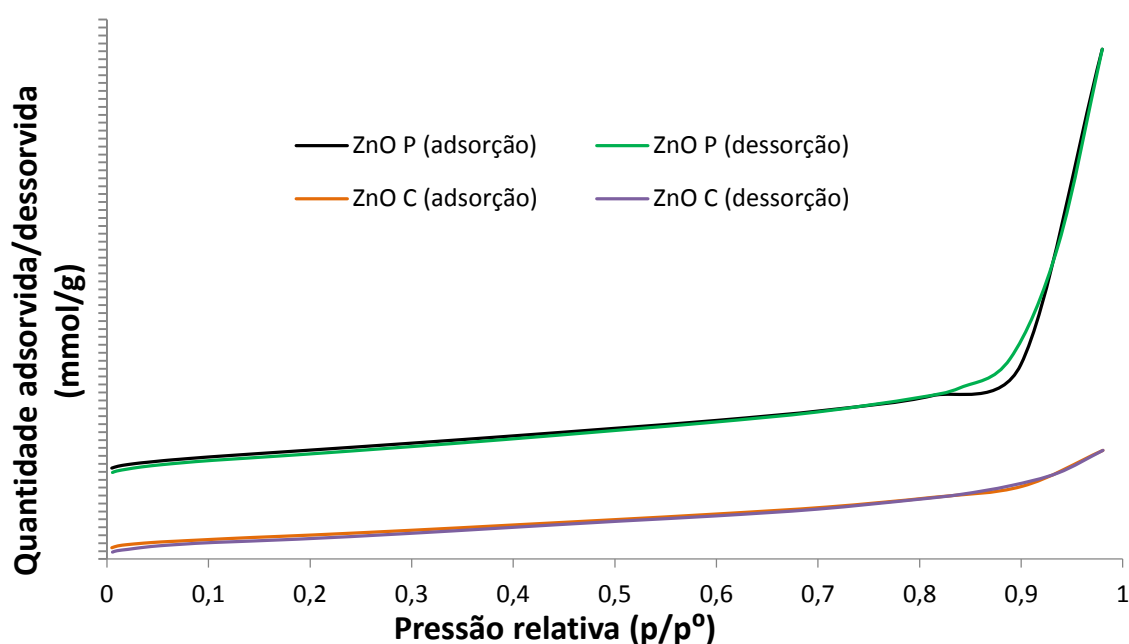


Figura 24 - Isotérmicas de adsorção/dessorção dos pós comerciais e precipitados.

As curvas de distribuição de tamanho de poro dos pós precipitados e dos comerciais, apresentadas na figura 25, revelam uma elevada contribuição de poros muito finos (tamanho médio $< 25 \text{ \AA}$) para a porosidade total da partícula. Possivelmente tais poros refletirão, no caso do pó precipitado, as camadas mais interiores da nanopartícula esférica, em linha com a observação anterior de que a estrutura da partícula se adensa à medida que evoluímos para o interior da partícula esférica. No pó precipitado observa-se também uma contribuição significativa de poros na ordem dos 200 \AA , o que pode ser atribuído às fendas superficiais entre as subunidades com forma de nanoplacas.

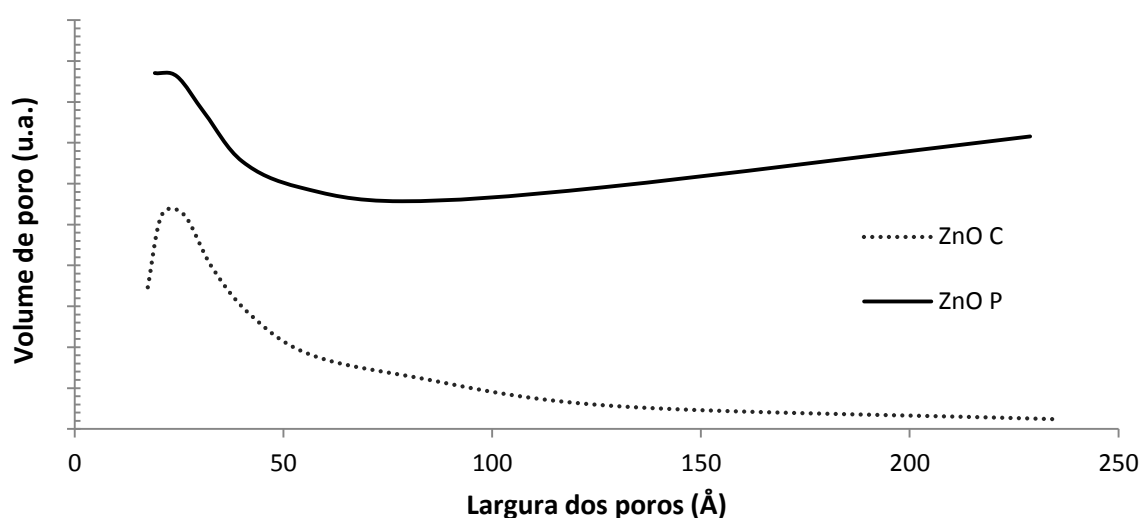


Figura 25 – Curvas de distribuição de tamanho de poro dos pós comerciais e precipitados.

Os pós precipitados apresentam área superficial específica (ASE), tamanho médio de poro (TMP) e diâmetro esférico equivalente (DEE) superiores aos comercialmente adquiridos (tabela 7).

Apesar de as partículas esféricas precipitadas apresentarem um tamanho na ordem dos microm (embora sejam constituídas por subunidades manométricas), superior a 100 nm (limite da classificação de nanopartícula [40,41]), a sua elevada ASE é correspondente à de partículas com diâmetro esférico de cerca de 65 nm , sendo assim possível atribuir-lhes a classificação de nanopartículas ou nanoestruturas.

O tamanho médio de poro calculado dos pós de óxido de zinco comercial é significativamente inferior ao dos pós precipitados o que se deve à contribuição dos poros com tamanhos na ordem dos 200 \AA (figura 25).

Tabela 7 - Algumas características dos pós comerciais (ZnO C) e precipitados (ZnO P).

| Pó | Tamanho de cristalite (nm) | Área superficial específica (m ² /g) | Tamanho médio de poro (nm) | Diâmetro esférico equivalente (nm) |
|-------|----------------------------|---|----------------------------|------------------------------------|
| ZnO C | 87 | 10,9 ± 1,5 | 6,4 | 99,5 |
| ZnO P | 42 | 16,2 ± 2,3 | 13,6 | 64,7 |

Na figura 26 apresentam-se os espectros de infravermelho dos pós de óxido de zinco (precipitado e comercial) objetos de estudo neste trabalho, e na tabela 8 identificam-se as bandas principais. Os espectros apresentam uma banda a 428 cm⁻¹ característica da ligação Zn-O. A banda encontrada a 1370 cm⁻¹ é atribuída à vibração de alongamento simétrica e assimétrica dos grupos carboxílicos (-COO-) provenientes da molécula do ácido cítrico (utilizado na síntese das nanopartículas). A 1570 cm⁻¹ encontra-se à banda atribuída à vibração do grupo N-H (devido ao azoto atmosférico). Por fim, a 3443 cm⁻¹ detetam-se as vibrações de alongamento do grupo hidroxilo (-OH) proveniente da adsorção de humidade atmosférica [96,97].

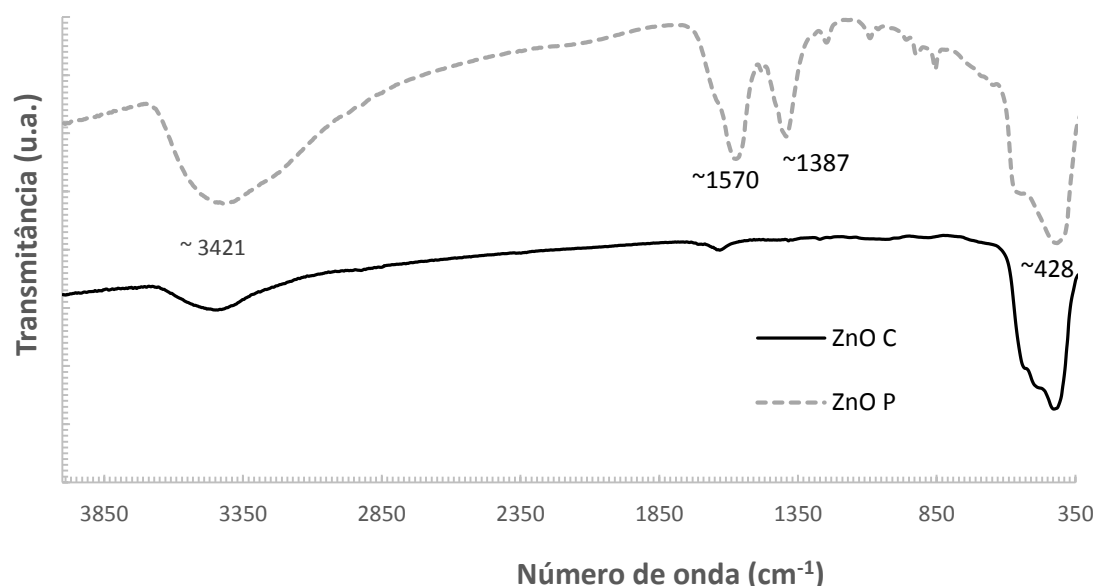
**Figura 26 - Espectro de infravermelhos do pó precipitado (ZnO P) e do adquirido comercialmente (ZnO C).**

Tabela 8 - Bandas de adsorção no infravermelho registadas no presente trabalho (figura 27) e respetiva referência na literatura.

| Bandas de adsorção de infravermelho (cm^{-1}) | | Descrição |
|--|---------------------|-----------------|
| Presente trabalho | Literatura [96][97] | |
| ~3421 | 3438 | Alongamento OH |
| ~1570 | 1580 | Vibração N-H |
| ~1387 | 1400 | Alongamento C=O |
| ~428 | 430 | Zn-O |

4.1.2 Caracterização do poliuretano

O poliuretano usado da marca Tecoflex ® foi adquirido comercialmente.

Na figura 27 encontra-se representado o difratograma de raios-X de um filme de poliuretano puro (C0). Como se pode observar, o filme apresenta uma estrutura essencialmente amorfa (característica do poliuretano).

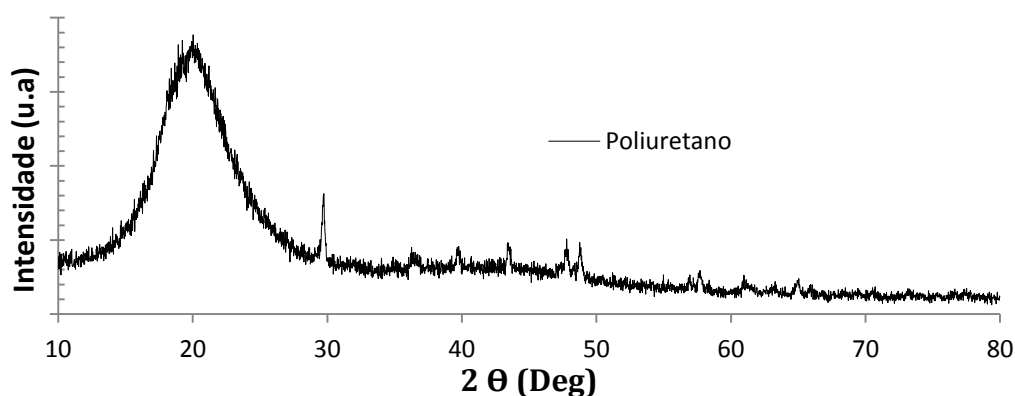


Figura 27 - Difratograma de raio – X de um filme de poliuretano puro.

Na figura 28 encontra-se representado o espectro de infravermelhos do poliuretano usado no presente trabalho (Tecoflex ®).

As bandas típicas do poliuretano são detetadas a 3314 cm^{-1} (A) correspondendo ao alongamento N-H; a 2935 cm^{-1} (B), 2855 cm^{-1} (C) e 2800 cm^{-1} (D) correspondendo ao alongamento assimétrico do CH_2 do poliéter e do ciclohexano, a 1715 cm^{-1} referente ao pico referente ao alongamento livre C=O, a 1103 cm^{-1} e 1033 cm^{-1} (N e O) atribuída ao

alongamento assimétrico C-O-C do poliéter e dos componentes da ligação uretano, confirmando assim tratar-se de um polímero poliuretano poliéter [98]. A tabela 9 sumariza estas observações.

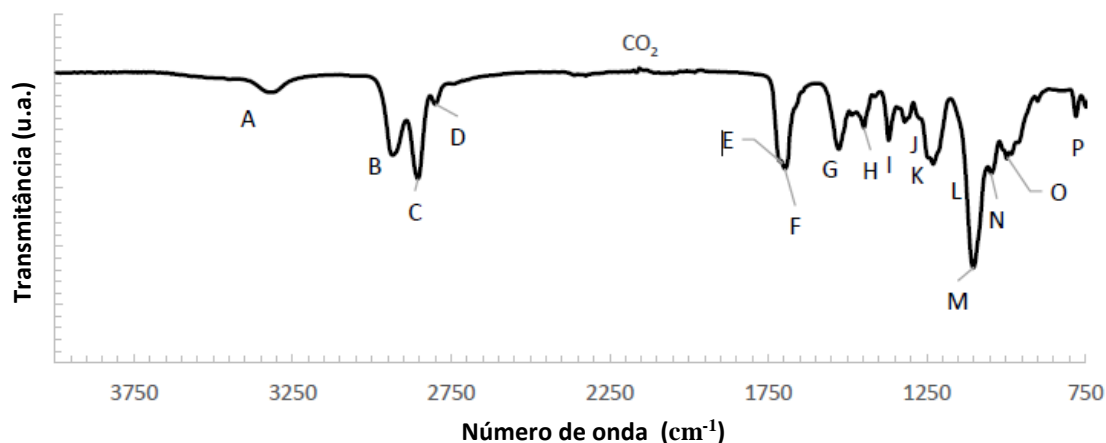


Figura 28 - Espectro de infravermelho do poliuretano comercial onde se assinalam as bandas de adsorção no infravermelho (A-P).

Tabela 9 - Bandas de adsorção no infravermelho representadas na figura 28 e a respetiva correspondência observada na literatura.

| Bandas de absorção no infravermelho (cm ⁻¹) | | | Tipo de vibração |
|---|-------------------|-----------------|--|
| | Presente trabalho | Referência [98] | |
| A | 3314 | 3323 | Alongamento N-H |
| B | 2935 | 2933 | Alongamento assimétrico CH ₂ : Cβ do poliéter e ciclohexano |
| C | 2855 | 2854 | Alongamento assimétrico CH ₂ : Cα/ Cβ do poliéter e ciclohexano |
| D | 2800 | 2795 | Alongamento simétrico CH ₂ : Cα do poliéter |
| E | 1715 | 1719 | Alongamento livre C=O |
| F | 1697 | 1701 | Alongamento C-O |
| G | 1527 | 1529 | Alongamento C-N e Flexão N-H |
| H | 1448 | 1447 | Flexão CH ₂ |
| I | 1370 | 1367 | Wagging CH ₂ |
| J | 1319 | 1320 | Alongamento C-C (ciclohexano) |
| K | 1230 | 1228 | Alongamento C-N |
| L | 1246 | 1245 | Wagging CH ₂ |
| M | 1229 | 1228 | Alongamento C-N |
| N | 1103 | 1110 | Alongamento assimétrico C-O-C: poliéter |
| O | 1033 | 1044 | Alongamento assimétrico C-O-C: uretano |
| P | 900 | 900 | Alongamento assimétrico do anel: ciclohexano |
| O | 779 | 779 | Anel do ciclohexano |

Na figura 29 apresenta-se a curva de calorimetria diferencial de varrimento do filme de poliuretano puro.

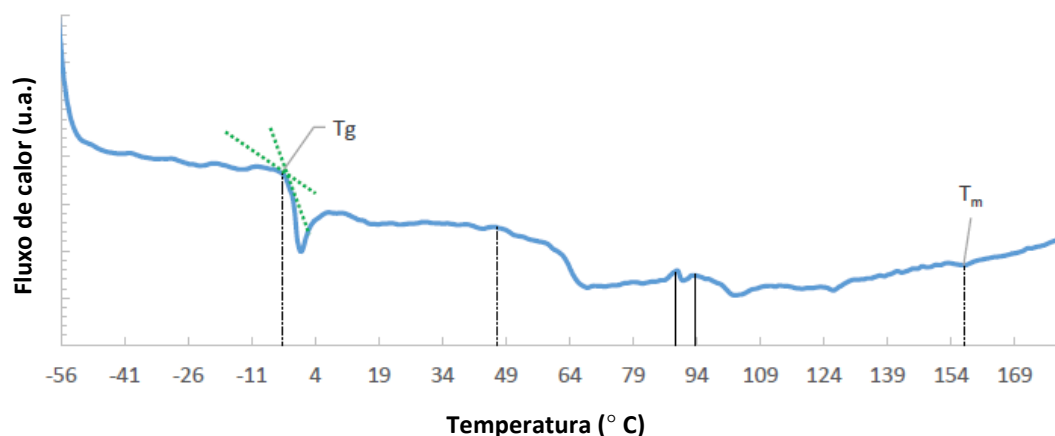


Figura 29- Curva DSC do filme de poliuretano puro.

Analisando-se a curva de DSC do poliuretano, a -4°C encontra-se a temperatura de transição vítrea (T_g) derivada do amolecimento do segmento mole do poliuretano. A 45°C o evento térmico é decorrente provavelmente da libertação de solventes. A 89°C e 93°C ocorrem picos exotérmicos atribuídos a temperaturas de cristalização. Finalmente a aproximadamente 158°C ocorre a fusão do polímero (T_m) [99].

Macroscopicamente, os filmes de poliuretano puro apresentam-se como uma membrana transparente e uniforme, com forma circular devido à conformação em copos cilíndricos (figura 30A). Observando ao microscópio eletrónico os filmes de poliuretano puro (figura 30B), estes apresentam-se com superfície uniforme, assinalando-se apenas alguns relevos, decorrentes provavelmente do processo de secagem.

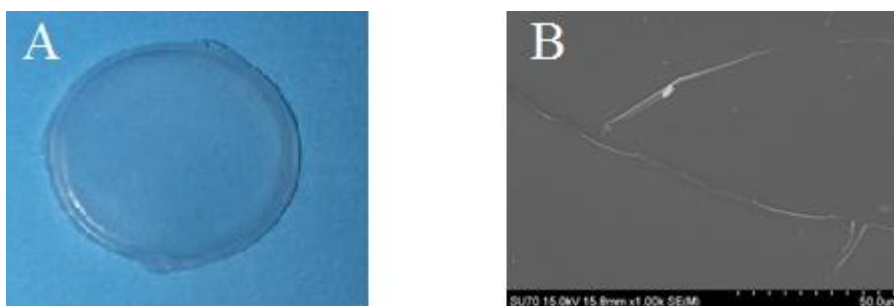
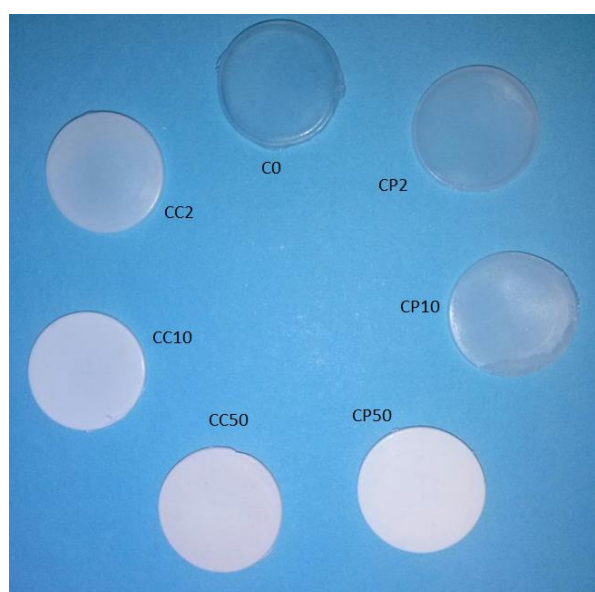


Figura 30 – Fotografia do filme de poliuretano puro (A) evidenciando o seu aspeto macroscópico e micrografia de SEM (B) ilustrando a microestrutura do mesmo filme.

4.2 Caracterização dos materiais compósitos PU/ZnO

Tal como os filmes de PU, os compósitos possuem a forma da base dos copos onde foram conformados. No entanto, consoante a percentagem de nanopartículas e o tipo de pó usado (comercial ou precipitado), os compósitos adquirem aspetos diferentes, variando entre membranas semitransparentes e membranas totalmente opacas. É de notar que com o aumento da percentagem em peso de nanopartículas, os compósitos vão adquirindo um tom esbranquiçado. Na figura 31 comparam-se os vários tipos de compósitos sintetizados durante o presente trabalho.



| Material | Constituição |
|-------------|-------------------|
| C0 | PU puro |
| CP2 | PU + 2% wt ZnO P |
| CP10 | PU + 10% wt ZnO P |
| CP50 | PU + 50% wt ZnO P |
| CC2 | PU + 2% wt ZnO C |
| CC10 | PU + 10% wt ZnO C |
| CC50 | PU + 2% wt ZnO C |

Figura 31 – Imagem (a olho nu) dos vários tipos de compósitos preparados ao longo do trabalho com o pó precipitado (CP2, CP10 e CP50) e com o pó comercial (CC2, CC10 e CC50) bem como do filme de poliuretano puro (C0), e as respetivas constituições.

Na figura 32 encontram-se representados os difratogramas dos compósitos preparados com o pó precipitado (CP2, CP10, CP50) e do filme de poliuretano puro (C0). Como foi referido anteriormente (figura 28), os filmes de poliuretano puro (C0) apresentam uma estrutura essencialmente amorfa. Os compósitos com 2% em peso de óxido de zinco precipitado (CP2) possuem uma curva relativamente similar à dos filmes de poliuretano puro, apresentando no entanto alguns picos correspondentes à presença de óxido de zinco e indicativos da fase wurtzite. Aumentando significativamente a quantidade de nanopartículas no compósito (CP50) a curva resultante assume uma configuração completamente diferente

das anteriores, assemelhando-se mais ao difratograma das nanopartículas de óxido de zinco precipitado (figura 17), denotando assim o elevado teor de nanopartículas.

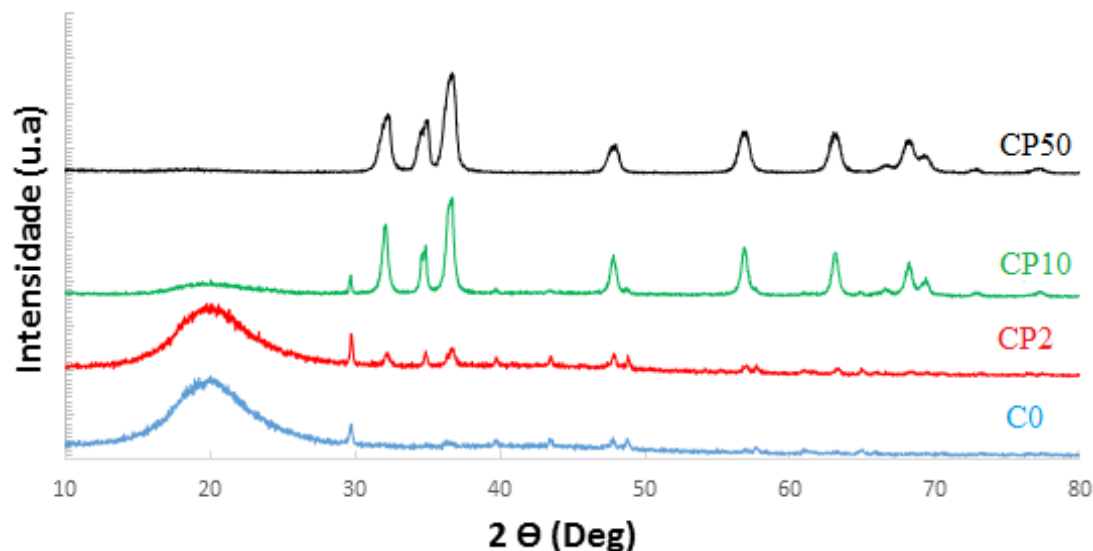


Figura 32 - Difratogramas dos compósitos preparados com o pó precipitado (CP2, CP10 e CP50) e, para efeitos comparativos, do filme puro de poliuretano (C0).

Na figura 33 encontram-se os espectros de infravermelho dos compósitos preparados a partir dos pós precipitados (CP2, CP10, CP50), dos pós comerciais (CC2, CC10, CC50) e do filme de poliuretano puro (C0) previamente apresentado (figura 28).

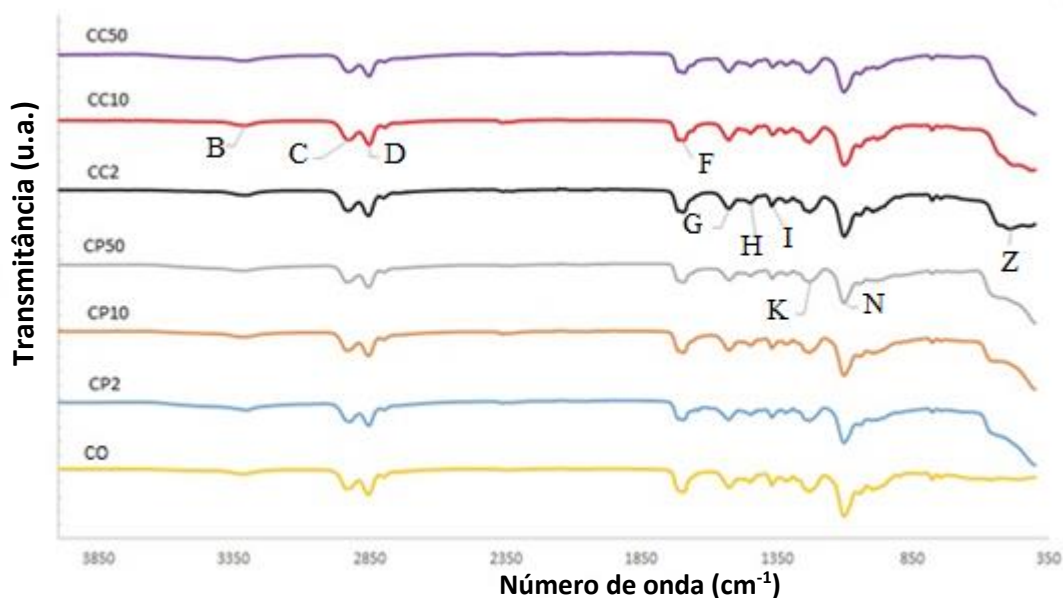


Figura 33 - Espectros de infravermelho dos compósitos preparados com os pós comerciais e com os pós precipitados bem como do filme de poliuretano puro.

Além dos picos previamente identificados no espectro do poliuretano puro (figura 27), observa-se também um pico a cerca de 400 cm^{-1} atribuído à presença da ligação Zn-O. Os espectros de infravermelho dos compósitos são assim similares ao espectro do filme de poliuretano puro diferindo na presença da banda associada ao óxido de zinco (tabela 10).

Tabela 10 - Bandas de adsorção no infravermelho indicadas na figura 33 e a respetiva correspondência observada na literatura.

| Banda | Bandas de absorção no infravermelho | | Bandas de adsorção |
|----------|-------------------------------------|--------------------|--|
| | Trabalho | Literatura [96,98] | |
| B | 2935 | 2933 | Alongamento assimétrico CH ₂ : Cβ do poliéter e ciclohexano |
| C | 2855 | 2854 | Alongamento assimétrico CH ₂ : Cα/ Cβ do poliéter e ciclohexano |
| D | 2800 | 2795 | Alongamento simétrico CH ₂ : Cα do poliéter |
| F | 1697 | 1701 | Alongamento C-O |
| G | 1527 | 1529 | Alongamento C-N e Flexão N-H |
| H | 1448 | 1447 | Deformação CH ₂ |
| I | 1370 | 1367 | <i>Wagging</i> CH ₂ |
| K | 1230 | 1228 | Alongamento C-N |
| N | 1103 | 1110 | Alongamento assimétrico C-O-C: Poliéter |
| O | 1033 | 1044 | Alongamento assimétrico C-O-C: uretano |
| Z | 400 | 445 | Zn-O |

4.3 Estudos de bioatividade

4.3.1 Pós de óxido de zinco

Como referido anteriormente na parte experimental, os pós de óxido de zinco foram imersos em SBF de modo a avaliar a sua bioatividade.

Nas figuras 34 e 35 encontram-se as micrografias de SEM dos pós de óxido de precipitado (ZnO P) e comercial (ZnO C), respetivamente após imersão em SBF.

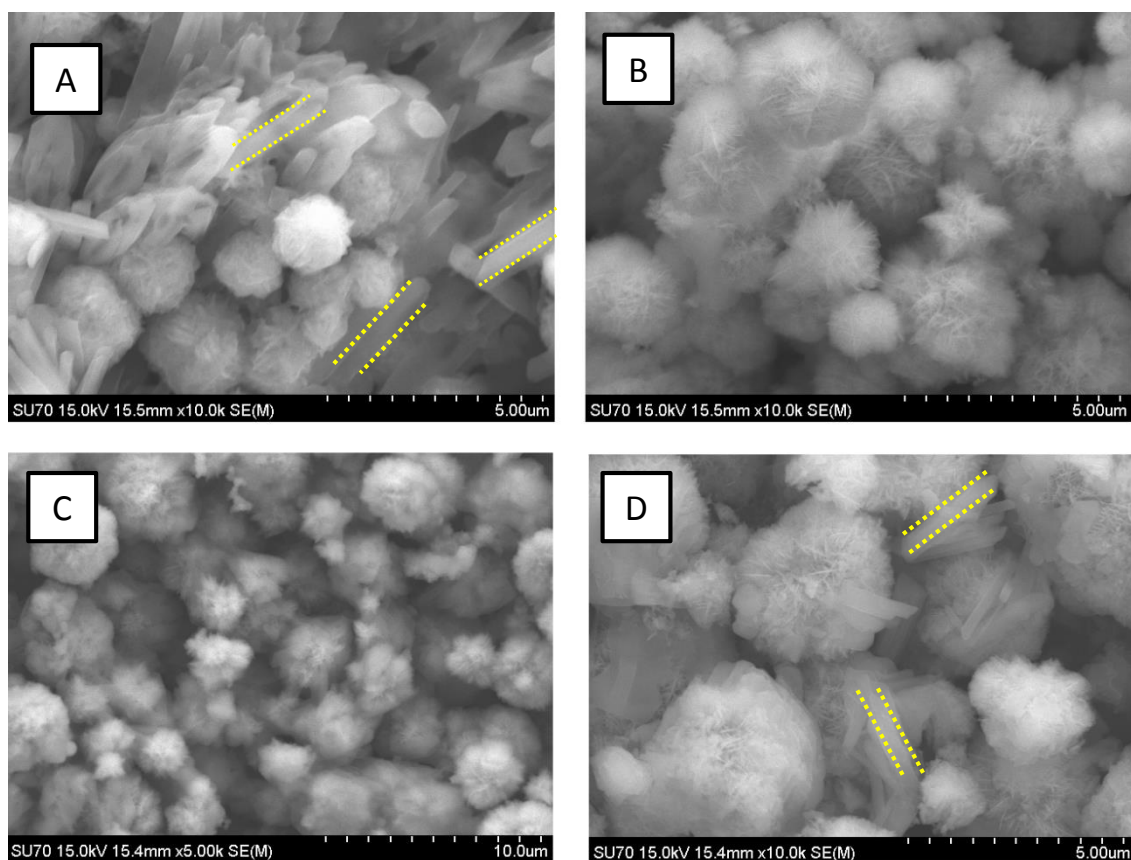


Figura 34 - Micrografias dos pós de óxido de zinco precipitados (ZnO P) após 1 dia (A), 7 dias (B), 14 dias (C) e 21 (D) dias de imersão em SBF. As estruturas prismáticas encontram-se realçadas a amarelo.

É visível uma dissolução superficial das nanopartículas logo após 1 dia de imersão, algo que se torna mais evidente para tempos mais longos de imersão. Nalgumas micrografias (correspondentes a 1 e 21 dias de imersão) verifica-se a presença de estruturas com forma de prismas alongados (realçadas a amarelos) hucom larguras inferiores médias de cerca de 100 a 150 μm . Supõe-se que a dissolução superficial é decorrente das trocas iónicas entre as nanopartículas e a solução envolvente.

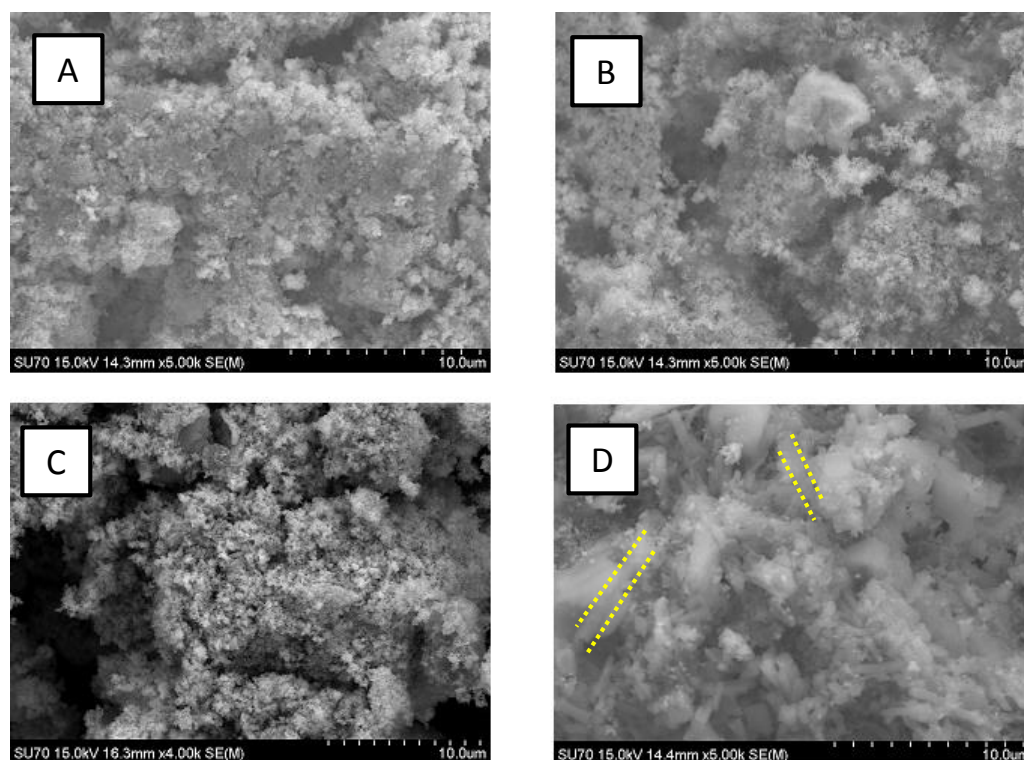


Figura 35 – Micrografias de SEM dos pós comerciais de óxido de zinco (ZnO C) após 1 dia (A), 3 dias (B), 7 dias (B) e 21 dias (D) de imersão em SBF. As estruturas prismáticas encontram-se realçadas a amarelo.

Nos pós comerciais de óxido de zinco não foi possível verificar alterações significativas após a imersão, exceto após 21 dias onde foram observadas as mesmas estruturas prismáticas observadas anteriormente após a imersão dos pós precipitados.

Na figura 36 apresentam-se os espectros de raio - X dos pós precipitados de óxido de zinco obtidos após alguns dos tempos de imersão em SBF. As fases cristalinas estão discriminadas na tabela 11.

É sabido que o ZnO cristaliza no sistema hexagonal e que a sua precipitação em solução aquosa contendo grupos orgânicos (aminas e álcoois) pode originar partículas alongadas e prismáticas como as detetadas na figura 34 (A e D) [100]. É possível que o ambiente químico do meio de imersão (solução SBF) tenha propiciado a dissolução das nanoplaquetas mais superficiais das partículas esféricas e a sua reprecipitação sob a forma de bastonetes prismáticos. A suportar esta hipótese pode apontar-se a alteração de intensidade relativa dos picos do DRX do ZnO precipitado ao fim dos vários tempos de imersão, quando comparado com o do pó original (figura 17). Esta alteração pode refletir o contributo de novas partículas, neste caso, os bastonetes prismáticos.

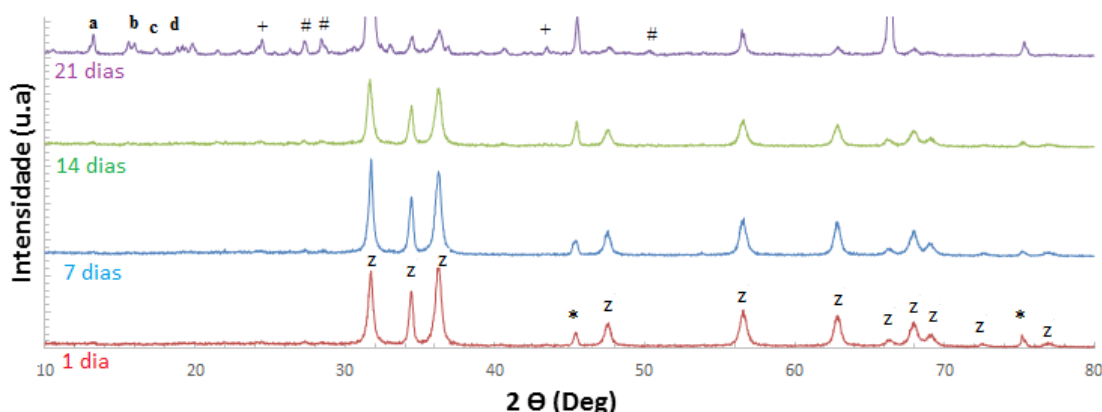


Figura 36 – Espetros de difração de raio-X do ZnO P após 1, 7, 14 e 21 dias de imersão em SBF, As fases cristalinas associadas aos picos assinalados estão identificadas na tabela 11.

Tabela 11 – Identificação das fases cristalinas correspondentes aos picos assinalados na figura 36.

| Denominação de pico | Composto atribuído |
|---------------------|--|
| a | $\text{Na}_3\text{P}_3\text{O}_9$ |
| b | $\text{Na}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ |
| c | $\text{CaZn}_2(\text{PO}_4)_2$ |
| d | $\text{Z}_3(\text{PO}_4)_2$ |
| + | $\text{Na}_6(\text{ZnPO}_4)_6 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ |
| # | $\text{NaZn}(\text{PO}_4)(\text{H}_2\text{O})$ |
| * | Cloreto de sódio |
| z | Óxido de zinco |

Em todos os tempos de imersão se nota a presença de fosfatos de sódio e zinco hidratados [$\text{Na}_6(\text{ZnPO}_4)_6 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$; $\text{NaZn}(\text{PO}_4)(\text{H}_2\text{O})$; $\text{Na}_3\text{P}_3\text{O}_9$; $\text{Z}_3(\text{PO}_4)_2$] e outros compostos de zinco e fósforo resultantes da interação dos iões presentes na solução de SBF com iões Zn^{2+} . É igualmente detetado cloreto de sódio (NaCl) provavelmente associado a uma lavagem insuficiente dos pós após imersão.

A hidroxiapatite não foi identificada nos pós após imersão. Admitiu-se a hipótese de precipitação de fases amorfas de fosfatos de cálcio pelo que se submeteram os pós a tratamento térmico a 800 °C com o objetivo de promover a cristalização de eventuais fases amorfas. Mesmo nestas condições não se detetam hidroxiapatite ou qualquer outro fosfato de cálcio cristalino.

Atendendo a que o fosfato de zinco apresenta uma constante de solubilidade significativamente inferior à de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, ocorre uma precipitação preferencial de fosfato de zinco em detrimento de outras fases contendo o ião fosfato como por exemplo os vários tipos de fosfato de cálcio [78].

Como foi referido anteriormente na revisão bibliográfica, a razão Ca/P é usada para classificar os compostos de fosfatos de cálcio. No presente trabalho usando os resultados de EDS, calcularam-se os valores de Ca/P dos pós submetidos a diferentes períodos de imersão em SBF. A figura 37 mostra a sua evolução ao longo do tempo e a razão Ca/P característica da hidroxiapatite.

Embora não se mantenham constantes, numa fase inicial sofrem uma diminuição estabilizando em valores próximos de 0,5. Os valores determinados para tempos mais longos não coincidem com os característicos de fosfatos de cálcio relevantes na engenharia biomédica incluindo a hidroxiapatite [7]. O que provavelmente deve-se ao aparecimento de fosfatos de sódio e zinco, cujas quantidades atómicas são quantificadas em EDS, influenciando o valor da razão Ca/P. Estes resultados estão de acordo com o observado com o observado na análise DRX dos pós ZnO P após imersão em SBF.

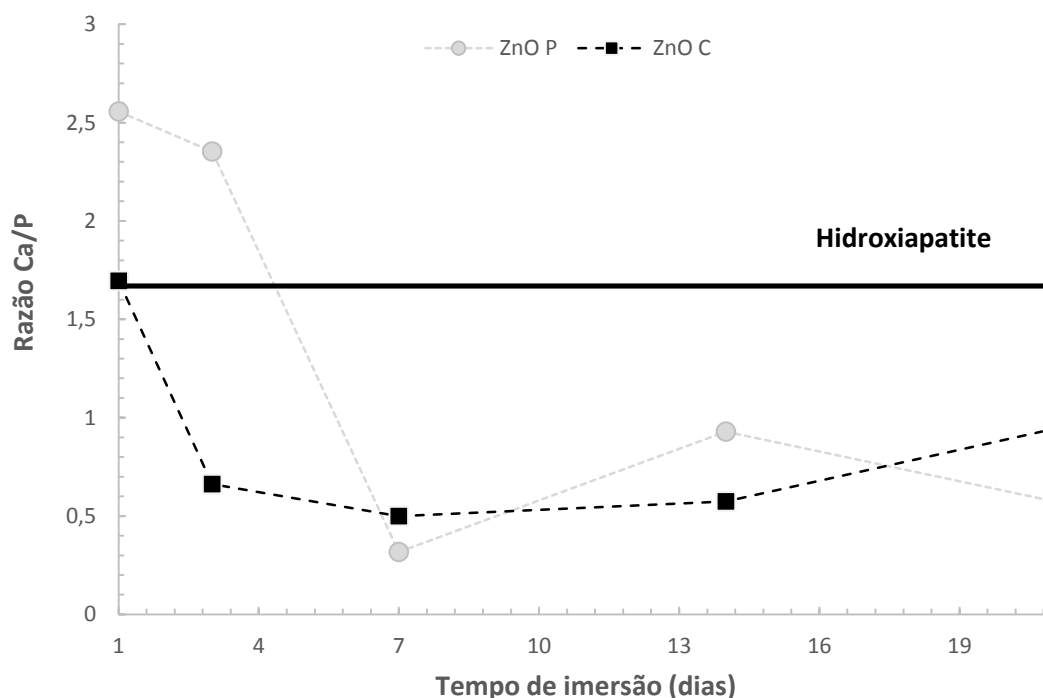


Figura 37 – Variação da razão Ca/P nos pós de óxido de zinco ao longo da imersão em SBF (linhas a tracejado para guiar os olhos), incluindo a razão Ca/P associada à hidroxiapatite - 1,67.

As amostras reservadas das soluções após imersão dos pós foram submetidas a análise por ICP, para quantificação de alguns iões presentes (Zn^{2+} ; Ca^{2+} e P^{5+}), sendo os resultados apresentados nas figuras 39, 39 e 40, respetivamente.

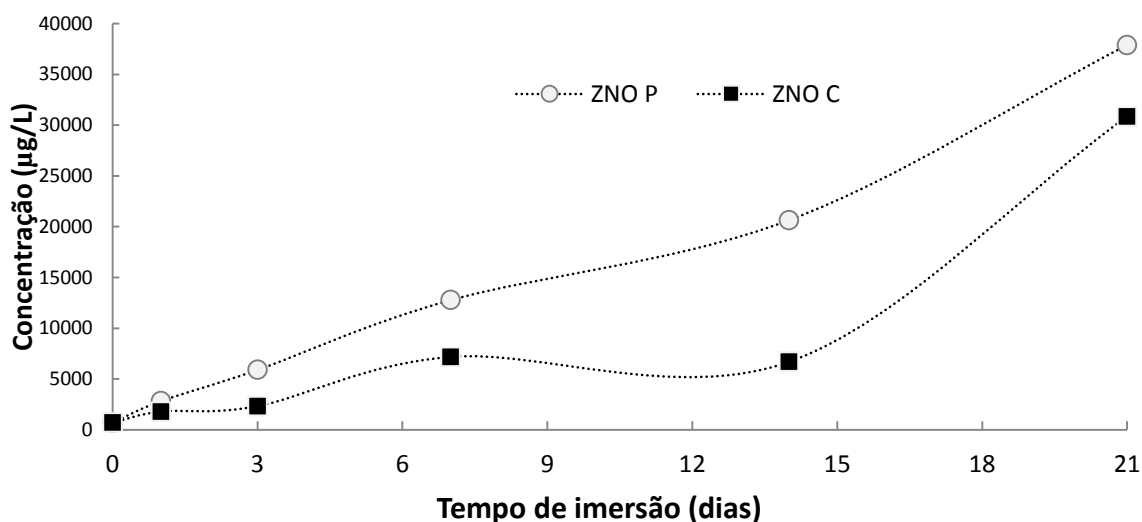


Figura 38 - Concentração iónica de zinco em SBF ao longo dos tempos de imersão dos pós de óxido de zinco.

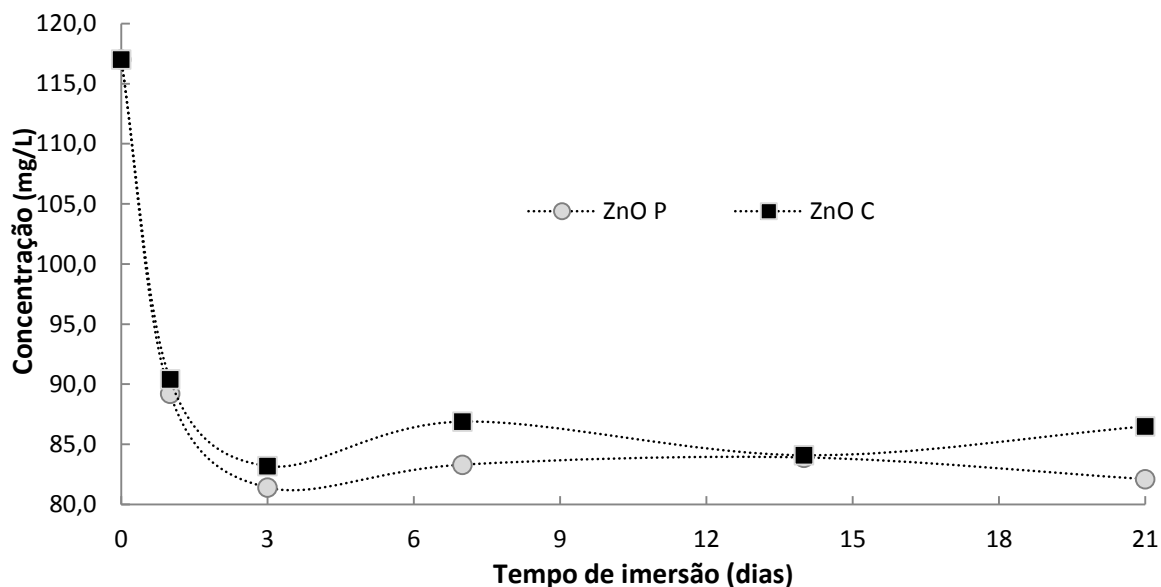


Figura 39 – Concentração iónica de cálcio em SBF ao longo dos tempos de imersão dos pós de óxido de zinco.

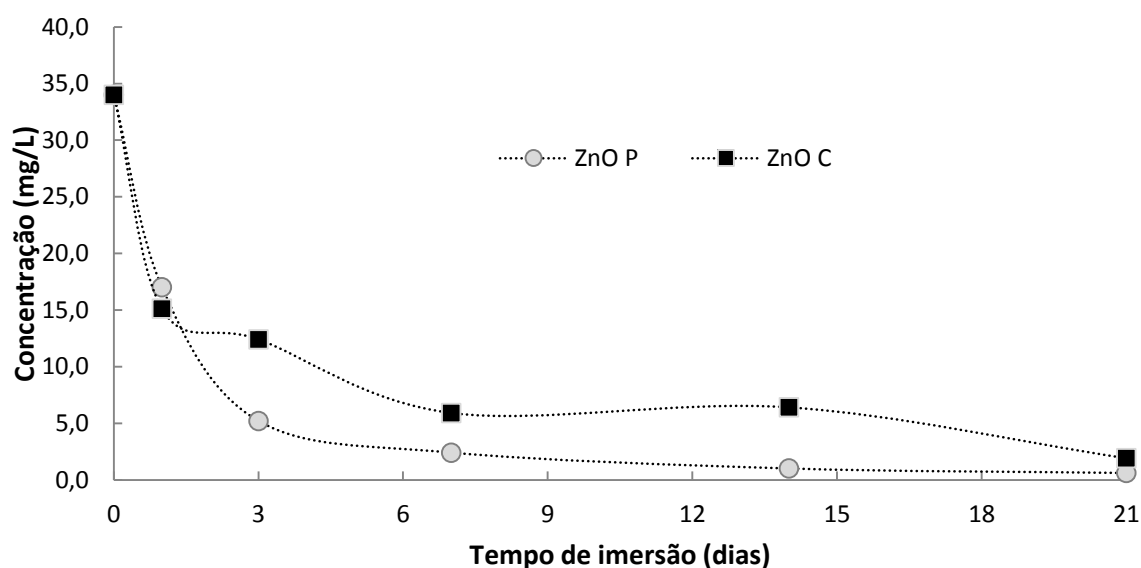


Figura 40 – Concentração iónica de fósforo em SBF ao longo dos tempos de imersão dos pós de óxido de zinco.

Os resultados indicam que há diminuição da concentração de cálcio e fósforo na solução. Ao contrário do que ocorre noutros estudos de bioatividade *in vitro*, a diminuição da concentração de cálcio e fósforo foram relacionadas com a reação destes elementos com zinco. O zinco na forma iónica é libertado pelas nanopartículas e reage os iões cálcio, fosforo e sódio presentes na solução de SBF, dando origem a fosfatos de sódio e zinco (detetados por DRX).

Embora o papel das espécies adsorvidas na capacidade bioativa das nanopartículas ainda não seja compreendido (a literatura ainda não abordou este campo), tentativamente pode-se estabelecer um paralelismo com a adsorção de iões cálcio e fosfato nos vidros bioativos. Sugerindo-se que as nanopartículas de óxido de zinco em solução possivelmente adsorvem as mesmas espécies iónicas (como se verifica com HCO_3^-) [65].

A concentração de zinco aumentou de forma constante com o tempo de imersão mas as quantidades observadas no caso do pó comercial foram superiores às do pó precipitado, provavelmente devido à sua cristalinidade superior e área superficial específica menor.

Nos dois tipos de pós óxido de zinco ao fim de 21 dias as concentrações foram superiores a $20 \times 10^3 \mu\text{g/L}$. Alguns autores apontam para um aumento significativo da citotoxicidade das nanopartículas de ZnO a partir desta concentração [57].

4.3.2 Compósitos de PU/ZnO

Amostras de todos os tipos de compósitos produzidos e dos filmes de poliuretano puro foram imersas em SBF, tendo sido retiradas após 1,3,7,14 e 21 dias. Findos os períodos de imersão, os compósitos foram submetidos a análise de raio-X, SEM, EDS, e FTIR.

Na figura 41, encontram-se as micrografias de SEM dos filmes de poliuretano puro após 1 (A) e 21 (B) dias de imersão em SBF. Não foi observada a formação de precipitados na superfície dos filmes, mesmo após 21 dias de imersão, nem quaisquer alterações significativas (atestando o comportamento inerte do poliuretano).

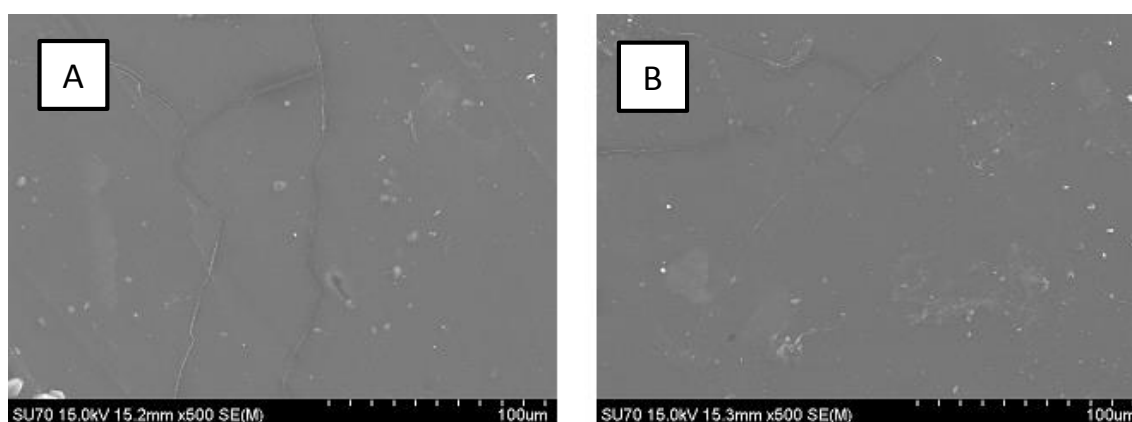


Figura 41 - Micrografias de SEM dos filmes de poliuretano após 1 (A) e 21 dias (B) de imersão em SBF.

Pelo contrário, nas micrografias dos compósitos CP2 após imersão (figura 42) é visível a formação de precipitados na superfície do compósito, logo após o primeiro dia. Estes precipitados após 14 dias cobrem totalmente a superfície do compósito (figura 43 C), adquirindo uma topografia irregular. Após 21 dias, verifica-se que a camada é constituída por subunidades semelhantes a alvéolos. Não foi possível identificar as fases pertencentes á camada através de difração de raio-X, o que indica o seu carácter maioritariamente amorfo.

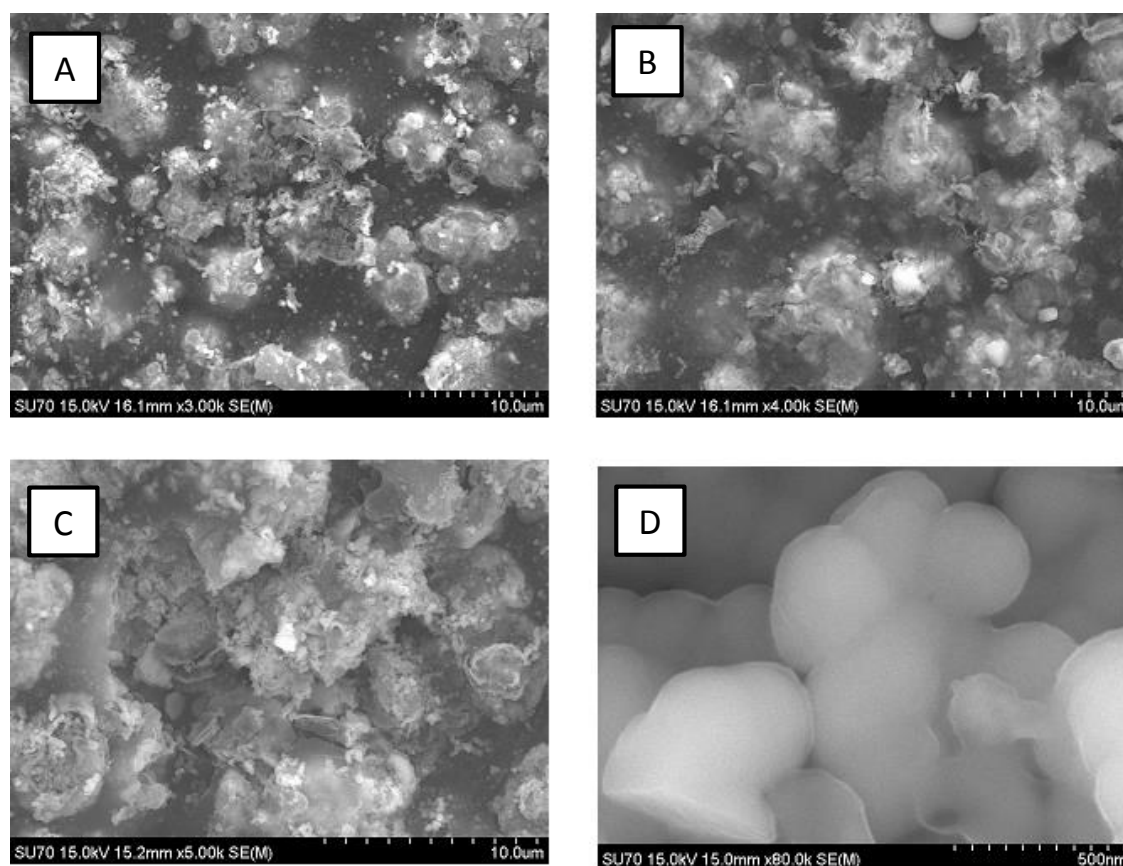


Figura 42 - Micrografias dos compósitos CP2 após 1 dia (A), 7 dias (B), 14 dias (C) e 21 dias (D) de imersão em SBF.

Segundo o espectro de EDS (figura 43), após 1 dia em fluido corporal simulado, são detetados elementos de cálcio e fósforo na superfície do compósito (o que não foi detetado nos compósitos antes das imersões). Isto sugere precipitação na superfície dos compósitos de compostos de cálcio e fosfato, provenientes da solução de SBF. No entanto, não pode afirmar-se seguramente que se trata de fosfatos de cálcio visto que nos difratogramas resultantes dos ensaios de bioatividade das nanopartículas foram atribuídas fases a fosfatos de zinco e sódio (apesar de no espectro de EDS não ser apresentado sódio, o pico a 1Kev também pode ser atribuído ao sódio). A análise de difração de infravermelhos (figura 44) também aponta para a presença de fósforo na camada superficial nos vários compósitos (tabela 12).

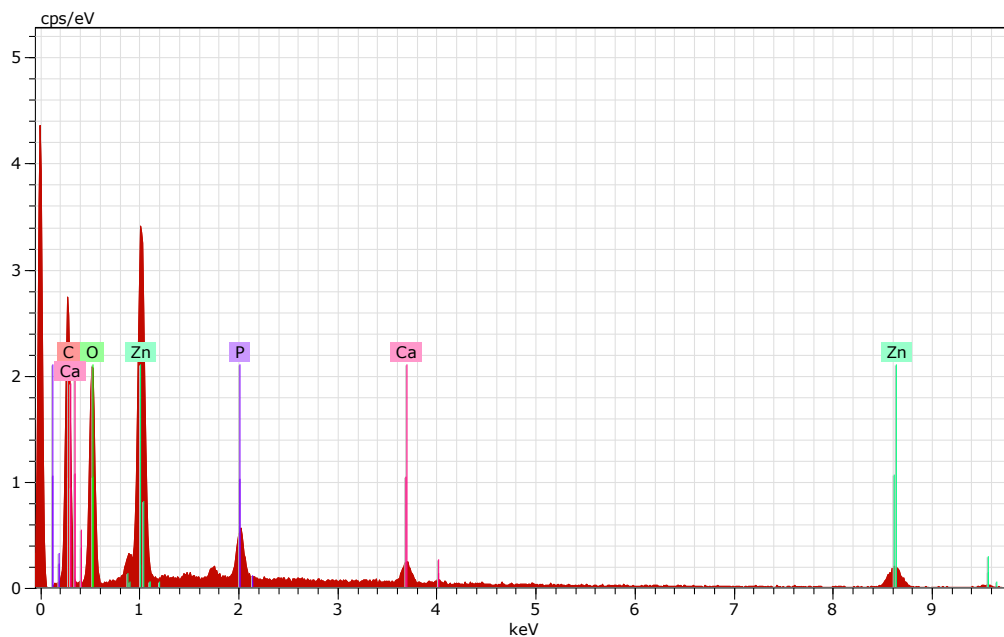


Figura 43 - Espectro de EDS do compósito CP2 após um dia de imersão em SBF.

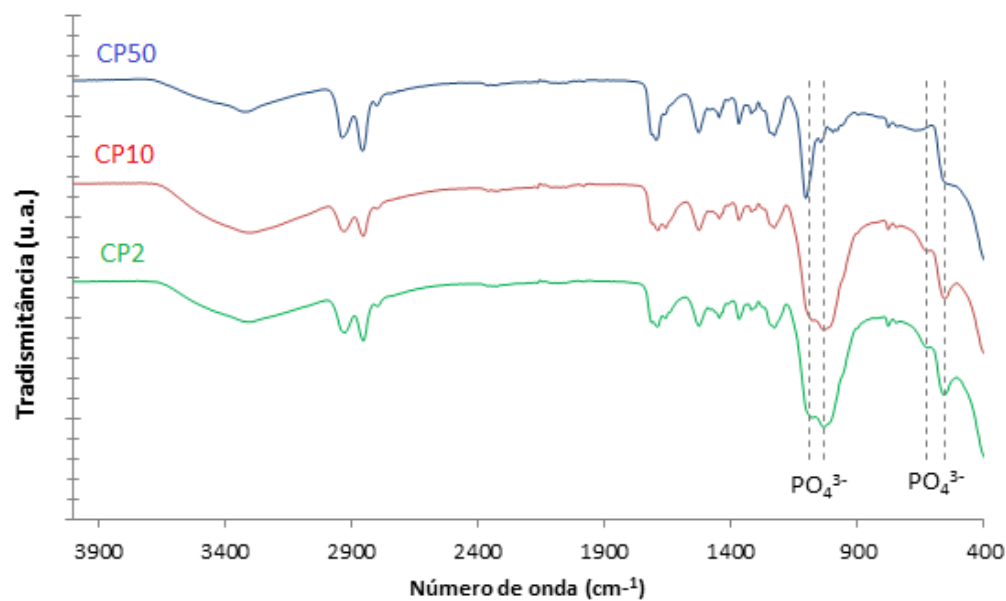


Figura 44 - Espectro no infravermelho dos compósitos CP2, CP10 e CP50 após 7 dias de imersão em SBF.

Tabela 12 – Bandas no infravermelho observadas nos compósitos após 7 dias de imersão em SBF em comparação com as descritas na literatura atribuídas à presença PO_4^{3-} .

| <i>Literatura</i> [83] | Observado | | | | | |
|------------------------|------------------|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|
| | CP2 | CP10 | CP50 | CC2 | CC10 | CC50 |
| 1095 | 1079 | 1079 | 1105 | 1100 | 1084 | 1081 |
| 1033 | 1033 | 1034 | 1045 | 1045 | 1037 | 1037 |
| 603 | 624 | 627 | - | - | - | - |
| 565 | 559 | 555 | - | - | - | - |

Nas figuras 45 e 46 encontram-se respetivamente representadas as evoluções das concentrações iónicas de zinco e de cálcio e fósforo ao longo dos tempos de imersão dos compósitos CP2 em SBF.

A concentração iónica de zinco na solução envolvente aumenta com o tempo de imersão, embora as quantidades detetadas na solução sejam significativamente inferiores às verificadas nas soluções em contato com as nanopartículas (figura 38), encontrando-se dentro dos limites de citotoxicidade associados às nanopartículas de ZnO ($20 \times 10^3 \mu\text{g/L}$), o que a matriz polimérica atua como uma barreira ao transporte, através da matriz, do ião zinco proveniente da nanoestrutura até à solução [101].

As concentrações de cálcio e fósforo diminuem até aos 7 dias de imersão, após esta data mantêm-se relativamente estáveis. Esta diminuição inicial provavelmente é causada pela precipitação destes iões na superfície do compósito formando uma camada superficial que recobre totalmente a superfície aos 14 dias (figura 42 C).

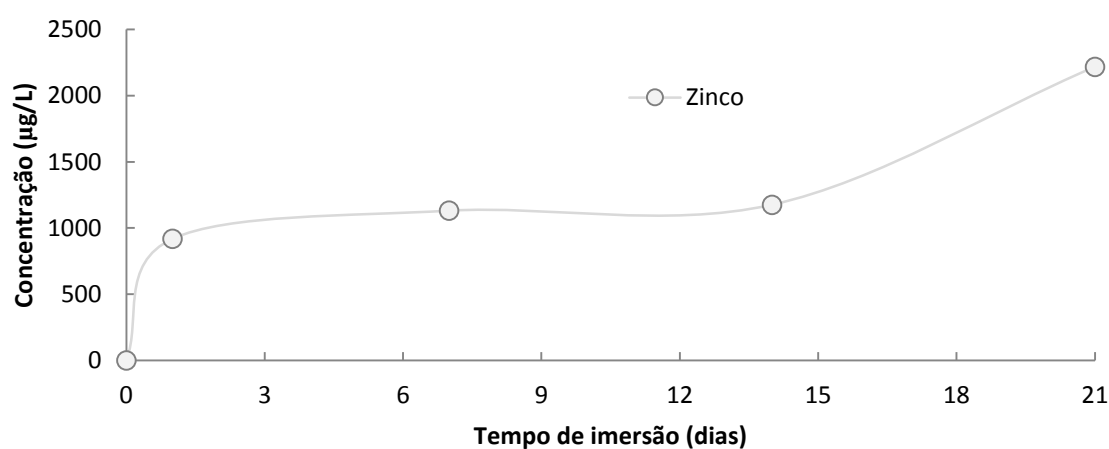


Figura 45 - Evolução da concentração iónica de zinco em SBF ao longo dos tempos de imersão dos compósitos CP2.

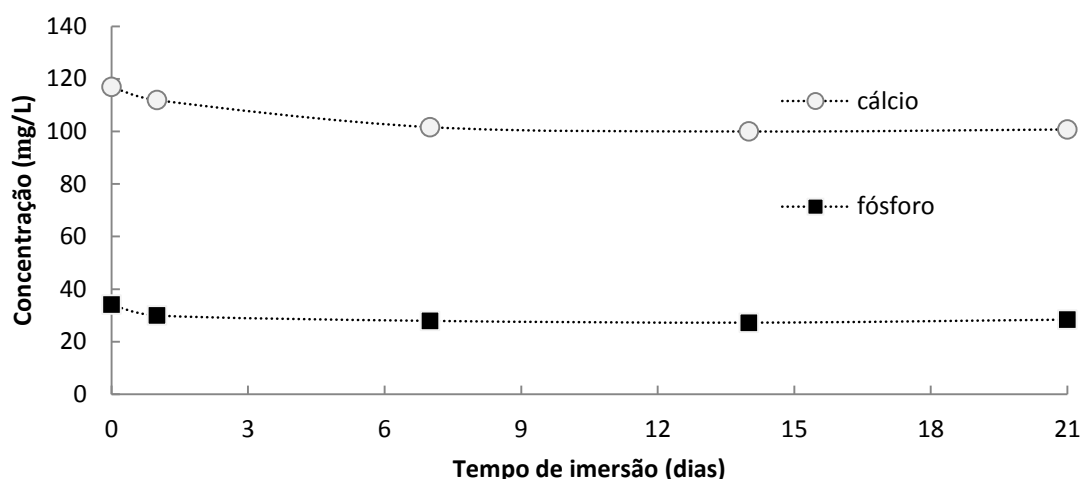


Figura 46 - Evolução das concentrações iônicas de cálcio e fósforo em SBF ao longo dos tempos de imersão dos compósitos CP2.

Nos compósitos CP10 a velocidade de formação da camada foi notoriamente mais rápida que nos CP2. Após 1 dia de imersão, o número de precipitados na superfície é notoriamente superior e após 7 dias a superfície do compósito já se encontra totalmente coberta pela camada. Para períodos de imersão mais longos, a camada apresenta uma superfície muito irregular, sendo visíveis estruturas semelhantes a alvéolos e fissuras (figura 47).

A análise por ICP das soluções de SBF após imersão dos compósitos CP10 mostrou maior quantidade de zinco libertado para a solução envolvente (figura 48) e quantidades iônicas de cálcio e fósforo (figura 49) ligeiramente menores que as observadas com os compósitos CP2.

Assume-se que esta diferença de resultados, comparativamente aos compósitos CP2, é consequência da maior percentagem em peso de ZnO P presente nos compósitos CP10 (10%). Os níveis de zinco presentes na solução após 21 dias (cerca de $3910 \mu\text{g/L}$) foram superiores aos observados nos compósitos CP2, no entanto, estes continuam abaixo do limiar de citotoxicidade de $20 \times 10^3 \mu\text{g/L}$.

Apesar de o ritmo de formação da camada ser muito mais pronunciado que no caso anterior, após 21 dias de imersão a análise de difração de raio-X também não apresentou fases diferentes das observadas nos compósitos antes de imersão, não se podendo inferir sobre a presença de fosfatos de cálcio cristalinos.

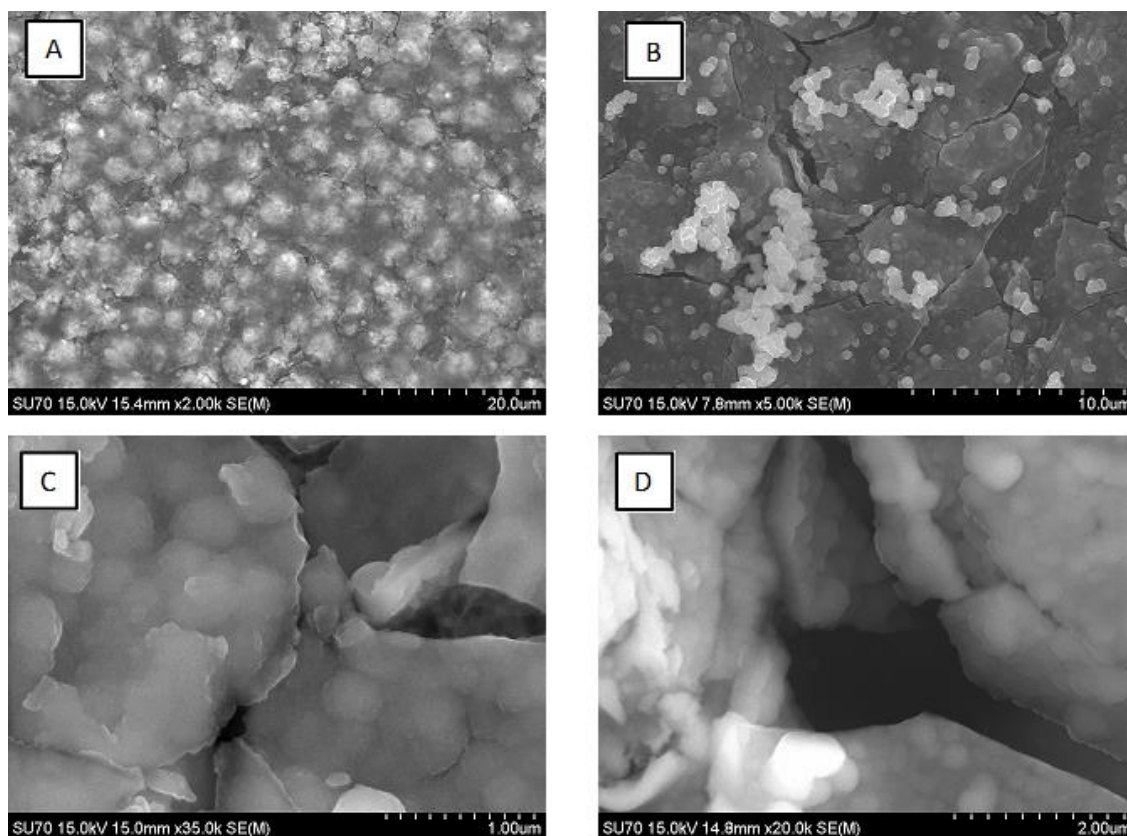


Figura 47- Micrografias de SEM dos compósitos CP10 após 1 (A), 7 (B), 14 (C) e 21 dias (D) de imersão em SBF.

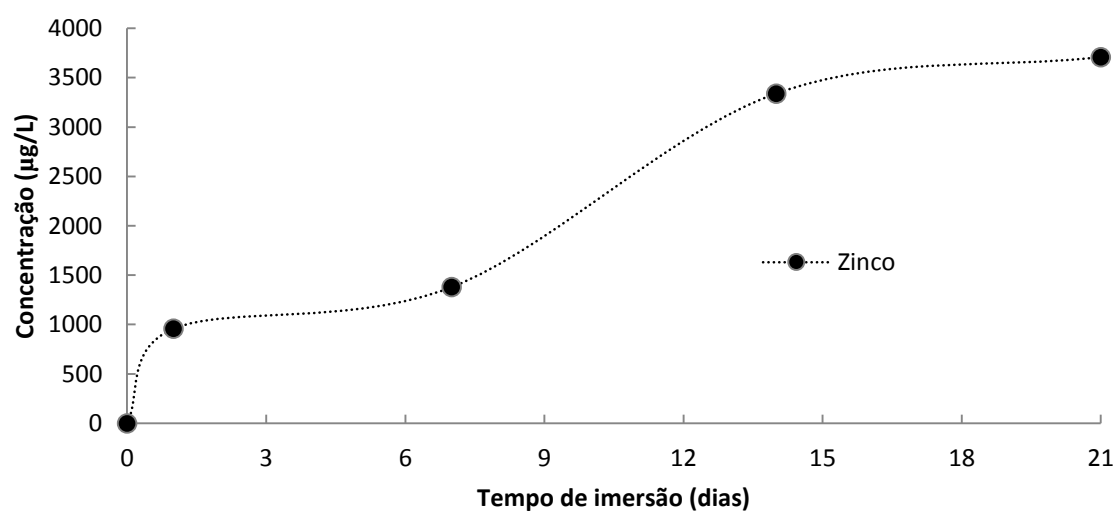


Figura 48 - Evolução da concentração iónica de zinco em SBF ao longo dos tempos de imersão dos compósitos CP10.

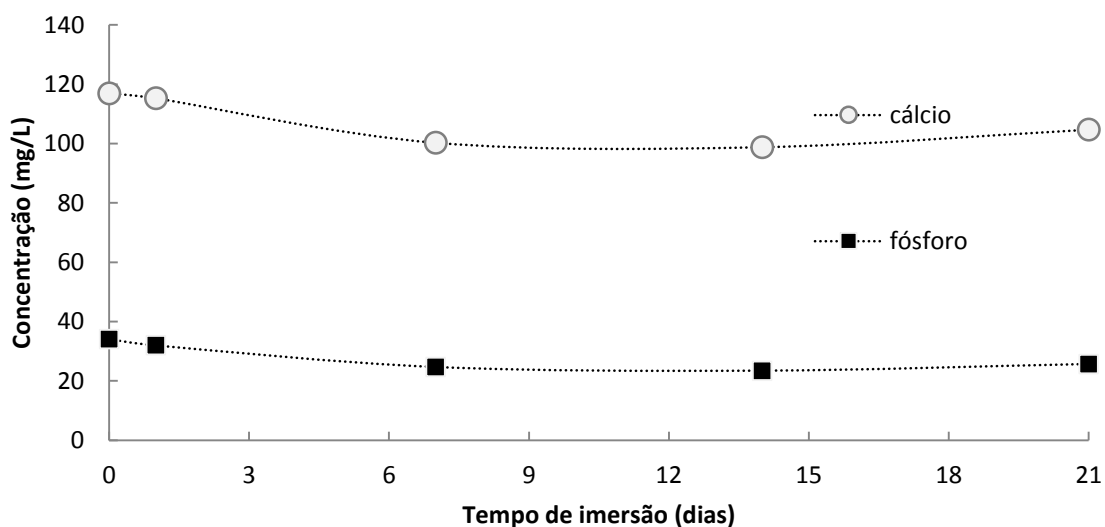


Figura 49 - Evolução das concentrações iónicas de cálcio e fósforo em SBF ao longo dos tempos de imersão dos compósitos CP10.

Na figura 50 são apresentadas as micrografias dos compósitos CP50 após imersão em SBF. Após 1 dia, é visível a formação de alguns precipitados na superfície do compósito. Dos compósitos preparados com base no pó precipitado, os CP50 foram os que apresentaram uma velocidade maior de formação de camada superficial, na medida em que após 7 dias de imersão, se verifica a presença de estruturas com a forma de alvéolos que só são visíveis em tempos mais longos nos compósitos CP2 e CP10. Em tempos mais longos (14 e 21 dias), a camada superficial apresenta-se com fissuras e topografia notoriamente irregular.

Analisando a evolução das concentrações iónicas de zinco (figura 51), e de cálcio e fósforo (figura 52), verifica-se que foram libertadas para a solução envolvente quantidades de zinco significativamente superiores às observadas nos outros compósitos, embora continuem a ser inferiores às verificadas nos estudos de bioatividade das nanopartículas (figura 38). Aos 7 dias de imersão, a concentração iónica de zinco atinge um máximo de cerca de 17000 $\mu\text{g/litro}$. Após os 7 dias verifica-se que a concentração de zinco na solução diminui significativamente, estabilizando de seguida. Este comportamento da curva é um indicador que o zinco libertado precipita na superfície do compósito provavelmente sob a forma de compostos de fosfatos de zinco. Apesar do valor máximo observado da concentração iónica de zinco ser significativamente superior aos observados nos outros compósitos preparados com o pó precipitado (figuras 45 e 48), este continua a ser inferior a $20 \times 10^3 \mu\text{g/L}$.

As concentrações de cálcio e fósforo decrescem inicialmente, aumentando após 7 dias (provavelmente devido á dissolução de partes da camada superficial) para depois voltarem a diminuir, adquirindo valores ligeiramente mais baixos que os verificados com os compósitos anteriores. A diminuição da concentração de cálcio e fósforo também pode ser indicativa da precipitação de compostos de fosfato de zinco.

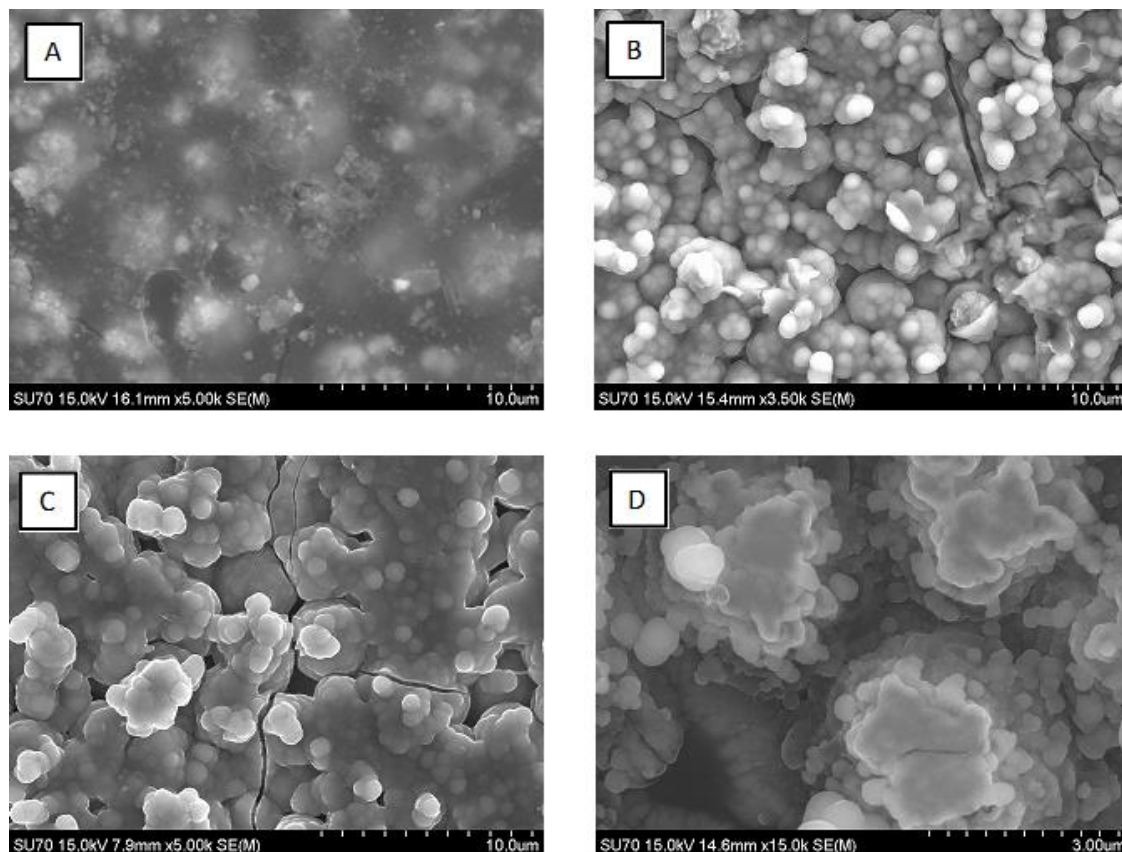


Figura 50 - Micrografias de SEM dos compósitos CP50 após 1 (A), 7 (B), 14 (C) e 21 dias (D) de imersão em SBF.

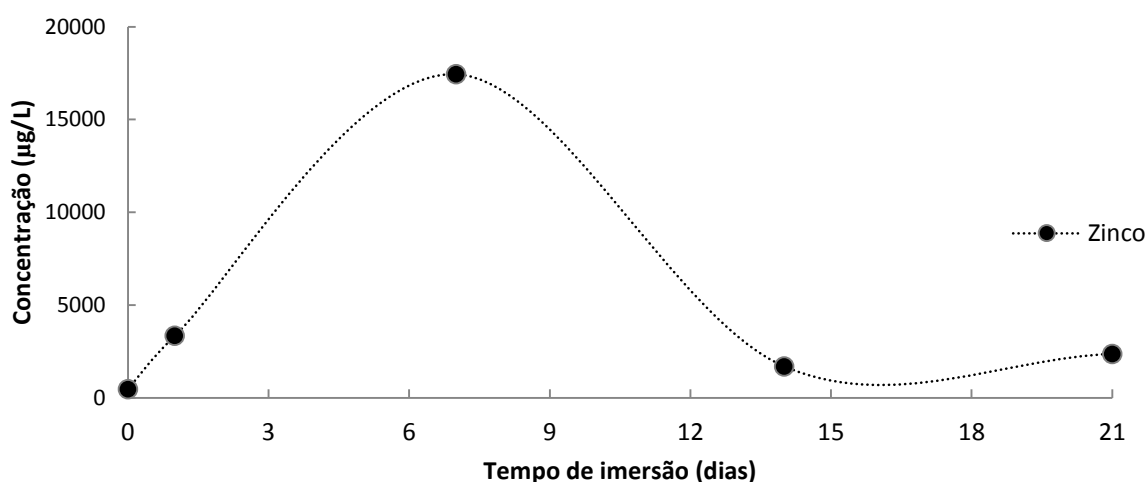


Figura 51 - Evolução da concentração iónica de zinco em SBF ao longo dos tempos de imersão dos compósitos CP50.

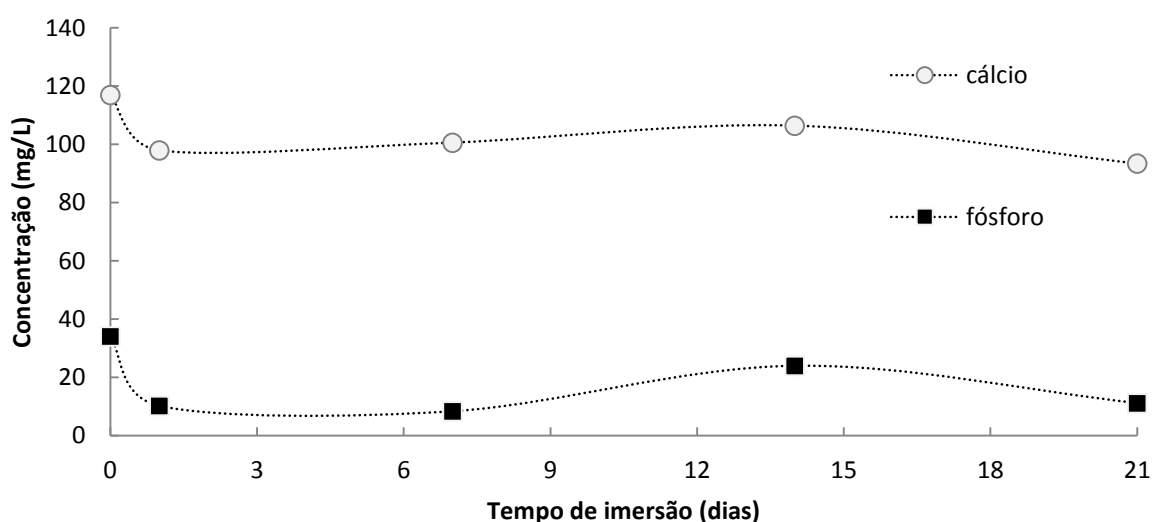


Figura 52 - Evolução das concentrações iónicas de cálcio e fósforo em SBF ao longo dos tempos de imersão dos compósitos CP50.

Na figura 53 encontram-se representados os espectros de difração de raio-X dos compósitos CP50 após diferentes tempos de imersão em SBF. Apesar de a maioria dos picos representados ser atribuída ao óxido de zinco presente nos compósitos, após alguns dias de imersão nota-se o aparecimento de um novo pico realçado a ($2\theta = 59,8$), atribuída à cristalização incipiente de uma nova fase.

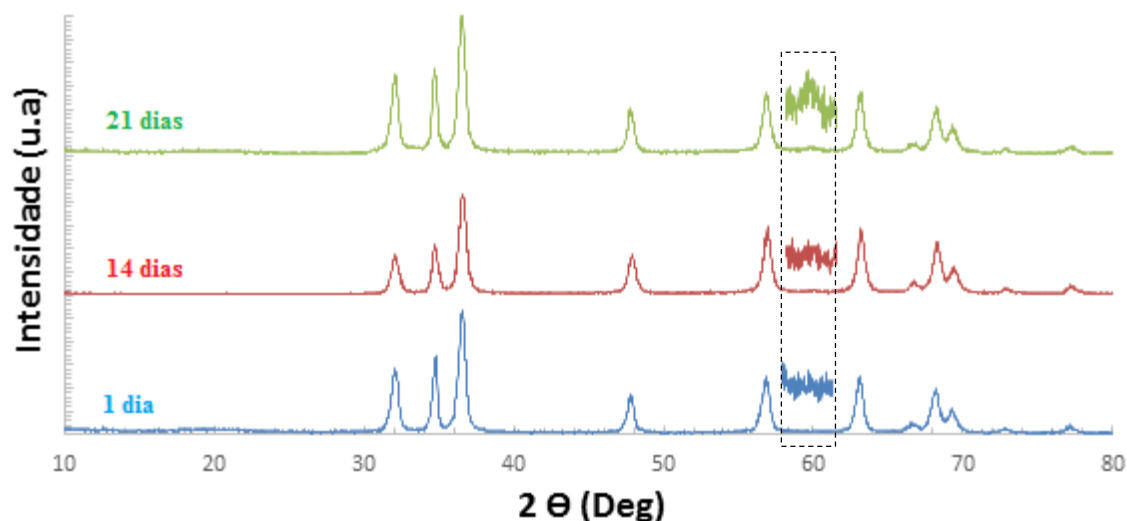


Figura 53 - Espetros de difração dos compósitos CP50 após 1, 14 e 21 dias de imersão em SBF, realçando do aparecimento do pico a $2\theta = 59,8^\circ$.

Apesar de o pico realçado poder ser atribuído a uma variedade de compostos (tabela 13), entre as fases cristalinas possíveis encontram-se fosfatos de cálcio e hidroxiapatite que são indicadores fortes de um carácter bioativo. No entanto, a fase cujo valor do ângulo de difração mais se aproxima do valor detetado é a hidroxiapatite.

Tabela 13 - Correspondências possíveis do pico detetado na figura 53.

| Fase cristalina possível | Hidroxiapatite | Fosfato de cálcio | Fosfato de zinco | Fosfito de cálcio zinco |
|------------------------------|----------------|-------------------|------------------|-------------------------|
| 2 θ | 59,94 | 59,16 | 59,59 | 59,32 |

As razões Ca/P dos compósitos CP2, CP10 e CP50 (figura 54) apresentam comportamentos similares ao longo dos tempos de imersão, apesar nos 21 dias os compósitos apresentarem razões similares (entre 0,45 e 0,6). Tal como acontece com as razões Ca/P das nanopartículas (figura 37), os valores determinados para tempos mais longos não coincidem com os característicos de fosfatos de cálcio relevantes na engenharia biomédica incluindo a hidroxiapatite [7]. O que provavelmente deve-se ao aparecimento de fosfatos de zinco, cujas quantidades atómicas são quantificadas em EDS, que irão influenciar a razão Ca/P.

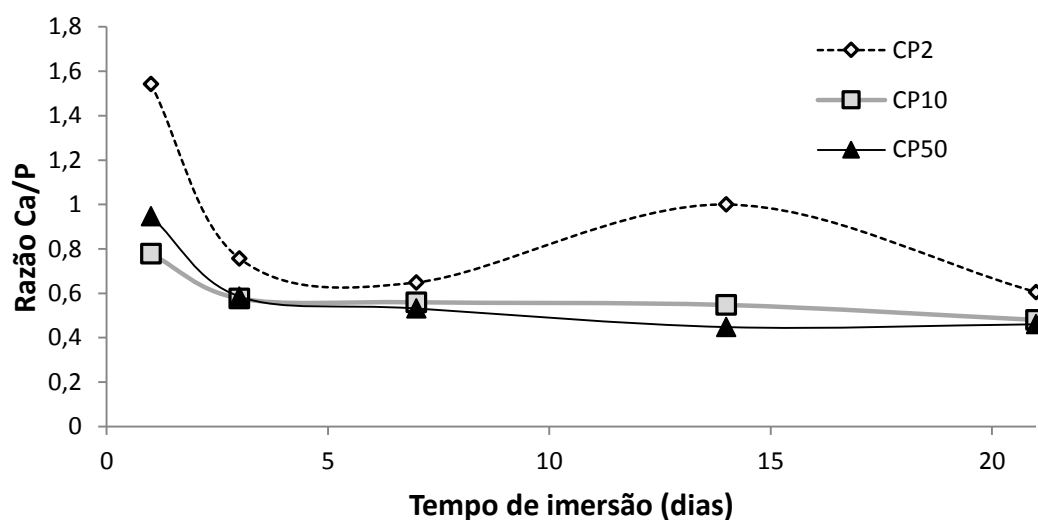


Figura 54 - Variação da razão Ca/P nos compósitos CP2, CP10 e CP50 ao longo do tempo de imersão em SBF.

Os compósitos CC2, CC10 e CC50 exibiram um comportamento diferente dos restantes compósitos nos estudos de bioatividade. Não se observou a formação de uma camada superficial notoriamente visível (mesmo após 21 dias de imersão em SBF) nem foram identificadas fases diferentes através de difração de raio-X. No entanto, a análise FTIR (tabela 10) deteta a presença de fósforo na superfície dos compósitos preparados com o pó comercial, indicando a formação de fosfatos. Na figura 55 encontram-se as micrografias dos compósitos CC50 após imersão em SBF.

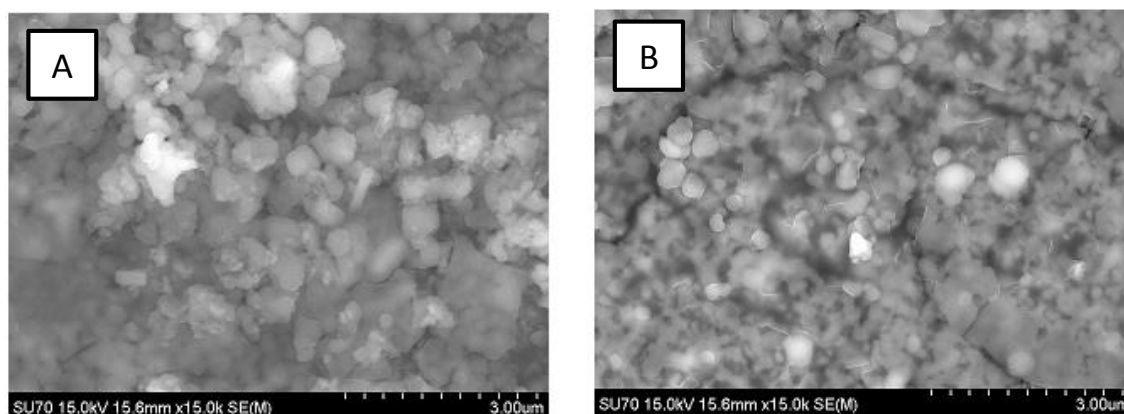


Figura 55 – Micrografias de Sem dos compósitos CC50 após 1 dia (A) e 21 dias (B) de imersão em SBF.

A quantidade de zinco libertada para a solução pelos compósitos CC50 (figura 56) foi significativamente inferior às verificadas nos compósitos preparados com o pó precipitado (CP2, CP10 e CP50), o que provavelmente deve-se às características das nanopartículas comerciais (cristalinidade superior e área superficial específica ligeiramente menor) que diminuem a libertação iónica de zinco para o meio envolvente.

As concentrações iónicas de cálcio e fósforo (figura 57) diminuem com a imersão em SBF, indicando a sua precipitação na superfície dos comósitos, embora não seja possível distinguir a formação de precipitados na superfície dos compósitos CC50 (figura 55).

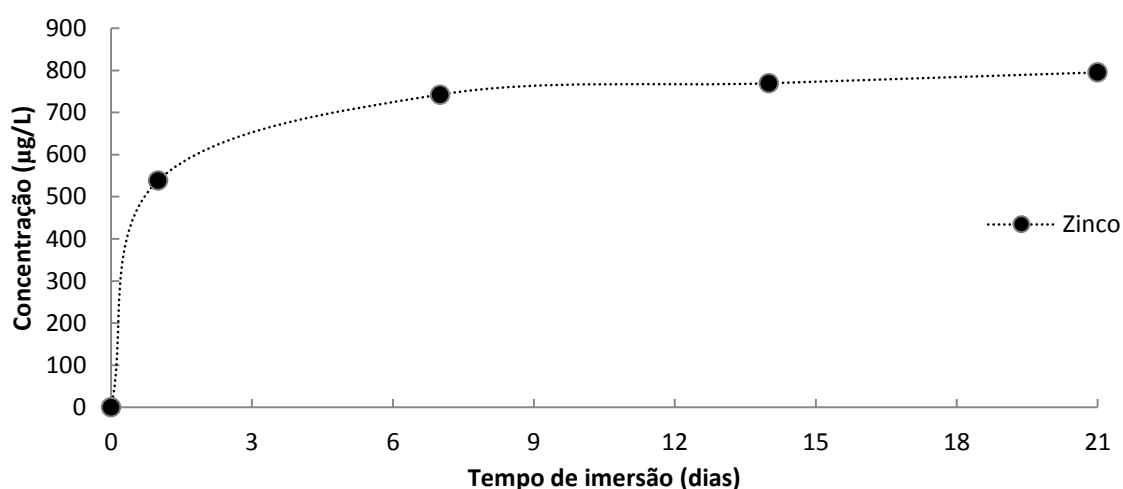


Figura 56 – Evolução da concentração iónica de zinco em SBF ao longo dos tempos de imersão dos compósitos CC50

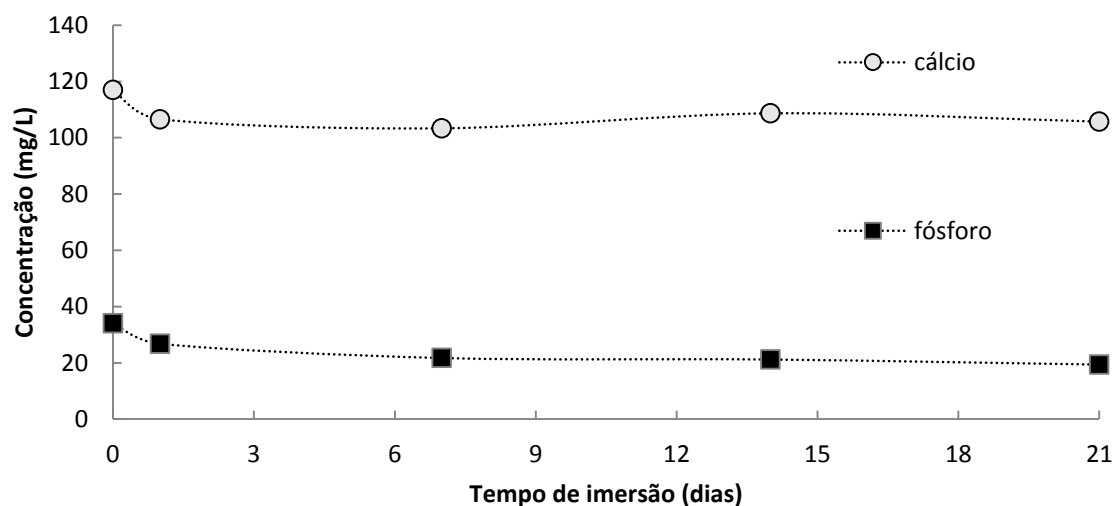


Figura 57 - Evolução das concentrações iónicas de cálcio e fósforo em SBF ao longo dos tempos de imersão dos compósitos CC50.

Capítulo V

5 Conclusão e trabalho futuro

O presente trabalho focou-se no estudo da capacidade bioativa de nanoestruturas de óxido de zinco. Compararam-se os comportamentos de nanoestruturas de origens diferentes, isto é, nanoestruturas sintetizadas por um método de precipitação química (ZnO P) e nanoestruturas comerciais (ZnO C) e exploraram-se os efeitos da sua incorporação em compósitos poliuretano/óxido de zinco (PU/ZnO) no comportamento bioativo dos mesmos.

Com este objetivo foram sintetizadas nanopartículas de óxido de zinco por um método de precipitação química. O controlo das condições experimentais de precipitação (pH, tipo e concentração de reagentes e de aditivos, e modo de adição dos reagentes) permitiu, com reprodutibilidade muito elevada, obter diretamente em solução e à temperatura ambiente, partículas esféricas de óxido de zinco (ZnO P). Morfologicamente, estas partículas assemelham-se a nanoflores esféricas, com um diâmetro médio de cerca de 4 a 5 μm , constituídas por subunidades nanométricas em forma de placas cuja espessura média ronda os 40 nm. Comparadas com as nanopartículas de ZnO C, as partículas de ZnO P apresentam maior área superficial específica, menor cristalinidade e uma orientação cristalográfica diferente.

Os estudos de bioatividade permitiram monitorizar a evolução de composição química, de fases cristalinas e de microestrutura dos pós em análise, durante os diferentes períodos de imersão em SBF. Em paralelo com esta monitorização, seguiram-se também as alterações de composição química da solução de SBF em termos do ião zinco, catião constituinte das estruturas em análise, e dos iões relevantes no contexto da bioatividade, ou seja, o ião cálcio e o ião fosfato. Os resultados obtidos evidenciaram que solução de SBF vai enriquecendo significativamente em Zn^{2+} ao longo do tempo ao passo que os perfis de concentração do Ca e do P decaem durante o mesmo período. Estes comportamentos estão em linha com os precipitados diversos que se observaram, envolvendo diferentes combinações de Zn, Ca e P. Tais precipitados atestam a capacidade das nanoestruturas de ZnO em interaccionar com o meio químico envolvente (SBF), potenciando a precipitação de alguns dos seus iões. Embora se tenha observado a precipitação de fosfatos de zinco e cálcio, não se detetou a precipitação de fosfatos de cálcio, facto este atribuído à solubilidade dos precipitados obtidos que é inferior à dos fosfatos de cálcio que potencialmente poderiam precipitar. Merece também ser realçado o facto de ter observado reprecipitação de partículas

de ZnO nanométrico. A denunciar a presença destas nanopartículas aponta-se a morfologia de bastonetes prismáticos alongados, observados em SEM, bem como as alterações no difratograma de raios-X, indiciadoras de mudança na orientação cristalográfica dos pós. O crescente teor de zinco em solução, mais elevado no caso dos pós ZnO P, acusa a degradabilidade das nanoestruturas iniciais, detetada nas análises por SEM, e que é mais acentuada nos pós ZnO P. Este facto reflete a diferença de cristalinidade e de área específica dos dois tipos de pó que por sua vez condicionam a solubilidade dos mesmos. Em ambos os tipos de nanopartículas, após 21 dias de imersão em SBF, os teores de zinco em solução são significativamente elevados, capazes de suscitar efeitos citotóxicos.

Com a incorporação das nanoestruturas ZnO P ou ZnO C numa matriz de PU, produziram-se materiais compósitos PU/ZnO, com diferentes teores de nanopartícula, ou seja, com 2% (CP2 e CC2), 10% (CP10 e CC10) e 50% (CP50 e CC50) em peso de ZnO. A exposição destes compósitos a solução de SBF, por imersão, possibilitou o estudo dos efeitos das características de cada tipo de partícula e da concentração da mesma no comportamento do compósito. No caso dos compósitos preparados com ZnO P (CP2, CP10 e CP50) observou-se por SEM a rápida formação de uma camada superficial que, após alguns dias, cobriu completamente a superfície dos compósitos. Observou-se também que a velocidade de formação da camada, a quantidade de zinco libertada para a solução de SBF e a depleção de cálcio e de fósforo na mesma solução aumentaram com o aumento do teor de ZnO no compósito. Devido à natureza amorfa da camada formada não foi possível identificar nos compósitos CP2 e CP10 outras fases cristalinas que não o óxido de zinco. Nos compósitos CP50, após 21 dias de imersão detetou-se uma alteração no difratograma de raios-X que poderá ser associada à presença de hidroxiapatite. No caso dos compósitos preparados com pó comercial (CC2, CC10 e CC50) não se observou a formação de precipitado na superfície do compósito apesar de se registar uma depleção de cálcio e fósforo na solução SBF envolvente. A quantidade de zinco libertada do compósito para a solução é inferior à observada no caso dos compósitos equivalentes preparados com ZnO P. Estas apreciáveis diferenças de comportamento *in vitro* foram atribuídas às diferenças de características que os dois tipos de pó exibem, designadamente a diferença de cristalinidade e de área superficial específica que continuam a condicionar a capacidade de interaccionar com a solução envolvente, apesar de aprisionadas na matriz de PU. Merece também ser destacado o facto de, em todos os compósitos, se ter observado uma diminuição na quantidade de zinco

libertada para a solução quando comparada com a registada no caso das nanoestruturas correspondentes isoladas. Esta observação é interpretada como indicação de que a matriz polimérica atua como uma barreira ao transporte, através da matriz, do ião zinco proveniente da nanoestrutura até à solução. Este papel moderador da matriz relativamente ao transporte de massa poderá beneficiar aplicações em que seja necessário controlar a toxicidade associada ao ião zinco em solução.

A rápida formação da camada superficial, os indícios que esta possui hidroxiapatite (no caso dos compósitos CP50) juntamente com a possibilidade de controlar (através da matriz de PU) os níveis de toxicidade associados às NP's ZnO reforçam a possibilidade de aplicação das nanopartículas de óxido de zinco precipitado na área de regeneração óssea.

Como trabalho futuro sugere-se:

- Realização de testes de biocompatibilidade (resazurina; alp/dna; dna/proteína; MTT).
- Estudos de molhabilidade.
- Monitorização do valor de pH ao longo da precipitação.
- Estudo das interações de superfície em solução das nanopartículas de óxido de zinco com determinação experimental do potencial zeta, ponto isoelétrico e ponto de carga zero.
- Substituição do poliuretano (Tecoflex®) por outro com uma degradação mais rápida ou até por outro polímero (PCL, PLLA, entre outros).
- Síntese de *scaffolds* com base nas nanopartículas e outros materiais (cerâmicos bioativos, polímeros, entre outros).
- Testes de compressão e tração.

Referências

- [1] Vaccaro AR. “The role of the osteoconductive scaffold in synthetic bone graft. Orthopedics 25, S571 – S578,2002.
- [2] Júnior JV de A. “Compósitos polímero / fosfato de cálcio para aplicações biomédicas.” Tese de Mestrado, Universidade de Aveiro, Aveiro, 2005.
- [3] Seeley RR, Tate P, Stephens TD. “Anatomia e Fisiologia.” 6ª Edição. Lusodidacta, Lisboa, 2005.
- [4] Luís JL. “Compósitos de PU/ZnO para aplicações biomédicas. Tese de Mestrado”, Universidade de Aveiro, Aveiro 2011.
- [5] Williams DF. “The Williams Dictionary of Biomaterials.” Academic Press, Chicago University; Chicago, 1999.
- [6] Lemons B, Ratner A, Hoffman F, Schoen J. “Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine.” 1ª Edição. San Diego: Academic Press; 2004.
- [7] Hench LL. “Bioceramics - From concept to clinic.” Journal of the American Ceramic Society ;74,1487–510,1991.
- [8] Hench LL. “The story of Bioglass (R).” Journal of Materials Science-Materials in Medicine ;17:967–78, 2006.
- [9] Jones JR. “Review of bioactive glass: From Hench to hybrids.” Acta Biomaterialia; 9 : 4457–86, 2013.
- [10] Kokubo T, Takadama H. “How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?” Biomaterials ;27:2907–15, 2006.
- [11] Wu C, Xiao Y. “Evaluation of the In Vitro Bioactivity of Bioceramics.” Bone and Tissue Regeneration Insights; 2:25–9, 2009.

- [12] Cao WP, Hench LL. “Bioactive materials.” *Ceramics International*; 22:493–507,1996.
- [13] Kokubo T, Kim HM, Kawashita M. “Novel bioactive materials with different mechanical properties.” *Biomaterials* 24: 2161–75, 2003.
- [14] Junqueira, L; Carneiro J. *Histologia Básica*. 12^a Edição, Guanabara Koogan; Rio de Janeiro: 2004.
- [15] Kneser U, Schaefer DJ, Polykandriotis E. “Tissue engineering of bone: the reconstructive surgeon’s point of view.” *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 10, 2006.
- [16] Stevens MM. “Biomaterials for bone tissue engeneering.” *Materials Today*,11,18–25,2008.
- [17] Hubbell JA. “Bioactive biomaterials. *Current Opinion in Biotechnology*” 10,123–9, 1999.
- [18] Bosetti M, Cannas M. “The effect of bioactive glasses on bone marrow stromal cells differentiation.” *Biomaterials*,26,3873–9, 2005.
- [19] Jones JR, Tsigkou O, Coates EE, Stevens MM, Polak JM, Hench LL. “Extracellular matrix formation and mineralization on a phosphate-free porous bioactive glass scaffold using primary human osteoblast (HOB) cells.” *Biomaterials* 28:1653–63, 2007.
- [20] Juhasz JA, Best SM. “Bioactive ceramics: processing, structures and properties.” *Journal of Materials Science*; 47:610–24, 2012.
- [21] Daguano JKM. “Biovidros e vitrocerâmicos do sistema 3CaO.P2O5-Si2O-MgO para aplicações biomédicas: processamento e caracterizações estruturais mecânicas e biológicas.” Tese de Mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.
- [22] Walsh DSW. “Calcium Phosphate Bioceramics: Past, Present and Future.” *Bioceramics*, vol. 15: 3–8, 2002.

- [23] Moseke C, Gbureck U. “Tetracalcium phosphate: Synthesis, properties and biomedical applications.” *Acta Biomaterialia*; 6:3815–23, 2010.
- [24] LeGeros RZ. “Properties of osteoconductive biomaterials: Calcium phosphates.” *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 81–98, 2002.
- [25] Cardoso DA, Jansen JA, Leeuwenburgh SCG. “Synthesis and application of nanostructured calcium phosphate ceramics for bone regeneration.” *Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials*; 100B:2316–26, 2012.
- [26] Predoi D, Vatasescu-Balcan RA, Pasuk I, Trusca R, Costache M. “Calcium phosphate ceramics for biomedical applications.” *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials*; 10:2151–5, 2008.
- [27] Holzapfel BM, Reichert JC, Schantz J-T, Gbureck U, Rackwitz L, Nöth U, et al. “How smart do biomaterials need to be? A translational science and clinical point of view.” *Advanced Drug Delivery Reviews*; 65:581–603, 2012.
- [28] Hoppe A, Gueldal NS, Boccaccini AR. “A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics.” *Biomaterials*, 32:2757–74, 2011.
- [29] Klingshirn C. “ZnO: Material, Physics and Applications.” *ChemPhysChem* 8, 6, 782–803, 2007.
- [30] Wang ZL. “Zinc oxide nanostructures: growth, properties and applications.” *Journal of Physics-Condensed Matter* 16:R829–R858, 2004.
- [31] Xu S, Wang ZL. “One-dimensional ZnO nanostructures: Solution growth and functional properties”. *Nano Research*; 4:1013–98, 2011.
- [32] Phuruangrat A, Thongtem T, Thongtem S. “Microwave-assisted synthesis of ZnO nanostructure flowers.” *Materials Letters* 63:1224–6, 2009.
- [33] Zhang Y, Ram MK, Stefanakos EK, Goswami DY. “Synthesis, Characterization, and Applications of ZnO Nanowires.” *Journal of Nanomaterials* 1–22, 2012.

- [34] Ozgur U, Alivov YI, Liu C, Teke A, Reshchikov MA, Dogan S “A comprehensive review of ZnO materials and devices.” *Journal of Applied Physics*; 98, 2005.
- [35] Rossi L, Migliaccio S, Corsi A, Marzia M, Bianco P, Teti A, “Reduced growth and skeletal changes in zinc-deficient growing rats are due to impaired growth plate activity and inanition.” *Journal of Nutrition* 131:1142–6, 2001.
- [36] Lynch RJM. “Zinc in the mouth, its interactions with dental enamel and possible effects on caries; a review of the literature.” *International Dental Journal*; 61:46–54. 2011.
- [37] Kawamura H, Ito A, Muramatsu T, Miyakawa S, Ochiai N, Tateishi T. “Long-term implantation of zinc-releasing calcium phosphate ceramics in rabbit femora.” *Journal of Biomedical Materials Research Part A*; 65A: 468–74 2003.
- [38] Pires A. “Sistemas compósitos de PU / ZnO para entrega de fármacos.” Tese de Mestrado. Universidade de Aveiro, Aveiro, 2012.
- [39] Rupasinghe RP. “Dissolution and aggregation of zinc oxide nanoparticles at circumneutral pH ; a study of size effects in the presence and absence of citric acid Tese de Mestrado, University of Iwoa, Iowa City, 2011.
- [40] Buzea C, Pacheco II, Robbie K. “Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity.” *Biointerphases*, vol. 2, p. MR17–71, 2007.
- [41] Ju-Nam Y, Lead JR. “Manufactured nanoparticles: an overview of their chemistry, interactions and potential environmental implications.” *The Science of the Total Environment*; 400:396–41,4, 2008.
- [42] Rasmussen JW, Martinez E, Louka P, Wingett DG. “Zinc oxide nanoparticles for selective destruction of tumor cells and potential for drug delivery applications.” *Expert Opinion on Drug Delivery*; 7:1063–77, 2010.
- [43] Liu B, Zeng HC. “Hydrothermal synthesis of ZnO nanorods in the diameter regime of 50 nm.” *Journal of the American Chemical Society*; 125:4430–1, 2003.

- [44] Kong XY, Ding Y, Yang R, Wang ZL. "Single-crystal nanorings formed by epitaxial self-coiling of polar nanobelts." *Science*; 303:1348–51, 2004.
- [45] Lao JY, Huang JY, Wang DZ, Ren ZF. "ZnO Nanobridges and Nanonails." *Nano Letters*; 3:235–8, 2003.
- [46] Liu J, Huang X, Li Y, Ji X, Li Z, He X, "Vertically Aligned 1D ZnO Nanostructures on Bulk Alloy Substrates: Direct Solution Synthesis, Photoluminescence, and Field Emission." *Journal of Physical Chemistry C*; 111:4990–7, 2007.
- [47] Wang Z, Kong X, Zuo J. "Induced Growth of Asymmetric Nanocantilever Arrays on Polar Surfaces." *Physical Review Letters*; 91:185502, 2003.
- [48] Liu Y-L, Yang Y-H, Yang H-F, Liu Z-M, Shen G-L, Yu R-Q. "Nanosized flower-like ZnO synthesized by a simple hydrothermal method and applied as matrix for horseradish peroxidase immobilization for electro-biosensing." *Journal of Inorganic Biochemistry*; 99:2046–53, 2005.
- [49] Yuan Q, Hein S, Misra RDK. "New generation of chitosan-encapsulated ZnO quantum dots loaded with drug: synthesis, characterization and in vitro drug delivery response." *Acta Biomaterialia*; 6:2732–9, 2010.
- [50] Yu L, Qu F, Wu X. "Facile hydrothermal synthesis of novel ZnO nanocubes." *Journal of Alloys and Compounds*; 504:L1–L4, 2010.
- [51] Zhu C, Lu B, Su Q, Xie E, Lan W. "A simple method for the preparation of hollow ZnO nanospheres for use as a high performance photocatalyst." *Nanoscale*; 4:3060–4, 2012.
- [52] Lam S, Sin J, Abdullah AZ, Rahman A. "Green hydrothermal synthesis of ZnO nanotubes for photocatalytic degradation of methylparaben." *Materials Letters*; 93:423–6, 2013.
- [53] Chen C, Liu P, Lu C. "Synthesis and characterization of nano-sized ZnO powders by direct precipitation method." *Chemical Engineering Journal*; 144:509–13, 2008.

- [54] Wahab R, Kaushik NK, Verma AK, Mishra A, Hwang IH, Yang Y-B “Fabrication and growth mechanism of ZnO nanostructures and their cytotoxic effect on human brain tumor U87, cervical cancer HeLa, and normal HEK cells.” *Journal of Biological Inorganic Chemistry*; 16:431–42, 2011.
- [55] Hanley C, Layne J, Punnoose A, Reddy KM, Coombs I, Coombs A, “Preferential killing of cancer cells and activated human T cells using ZnO nanoparticles.” *Nanotechnology*, 19, 2008.
- [56] Reddy KM, Feris K, Bell J, Wingett DG, Hanley C, Punnoose A. “Selective toxicity of zinc oxide nanoparticles to prokaryotic and eukaryotic systems.” *Applied Physics Letters*, 90, 2007.
- [57] Zhang J, Song W, Guo J, Zhang J, Sun Z, Ding F “Toxic effect of different ZnO particles on mouse alveolar macrophages.” *Journal of Hazardous Materials*; 219:148–55, 2012.
- [58] Jia-han Li Yue Zhang, Fang-fang Tian, Guang-yuan Zhao, Qiu-li-yang Yu, Feng-lei Jiang XL, Liu and Y. “Toxicity of nano zinc oxide to mitochondria.” *Toxicology Research*, 2012.
- [59] De Berardis B, Civitelli G, Condello M, Lista P, Pozzi R, Arancia G, “Exposure to ZnO nanoparticles induces oxidative stress and cytotoxicity in human colon carcinoma cells.” *Toxicology and Applied Pharmacology*; 246:116–27, 2010.
- [60] Zhang H, Chen B, Jiang H, Wang C, Wang H, Wang X. “A strategy for ZnO nanorod mediated multi-mode cancer treatment.” *Biomaterials*; 32:1906–14. 2011
- [61] Guo D, Wu C, Jiang H, Li Q, Wang X, Chen B. “Synergistic cytotoxic effect of different sized ZnO nanoparticles and daunorubicin against leukemia cancer cells under UV irradiation.” *Journal of Photochemistry and Photobiology B, Biology*; 93:119–26, 2008.

- [62] Patila, Swanand Sandbergb A, Heckertc Eric; Selfc, William; Sudipta S. “Protein adsorption and cellular uptake of cerium oxide nanoparticles as a function of zeta potential”. *Biomaterials*; 28: 4600 – 7, 2008.
- [63] Costa MEJV “Preparação e propriedade eléctricas de sensores de humidade baseados em cerâmicos de ZnO.” Tese de Doutoramento, Universidade de Aveiro, Aveiro 1996.
- [64] Al-Hilli S, Willander M. “The pH Response and Sensing Mechanism of n-Type ZnO/Electrolyte Interfaces.” *Sensors*; 9:7445–80, 2009.
- [65] Sedlak A, Wladyslaw J. “Specific adsorption of carbonate ions at the zinc oxide/electrolyte solution.” *Physicochemical Problems of Mineral Processing*; 42:57–66, 2008.
- [66] Willander M, Zhao QX, Hu Q, Klason P, Kuzmin V. “Fundamentals and properties of zinc oxide nanostructures : Optical and sensing applications.” *Superlattices and Microstructures*; 43:352–61, 2008.
- [67] Degen A, Kosec M. “Effect of pH and impurities on the surface charge of zinc oxide in aqueous solution; *Journal of the European Ceramic Society* 20:667–73 2000.
- [68] Bian S-W, Mudunkotuwa I a, Rupasinghe T, Grassian VH. “Aggregation and dissolution of 4 nm ZnO nanoparticles in aqueous environments: influence of pH, ionic strength, size, and adsorption of humic acid.” *Langmuir : the ACS Journal of Surfaces and Colloids*, 27:6059–68, 2011.
- [69] Trimbo HF., Stein H. “The zno/aqueous solution interface. II. mechanism of the slow process.” *Journal of Colloid and Interface Science*; 77:397–406, 1980.
- [70] Mohd Omar F, Abdul Aziz H, Stoll S. “Aggregation and disaggregation of ZnO nanoparticles: Influence of pH and adsorption of Suwannee River humic acid.” *The Science of the Total Environment*; 468-469C:195–201, 2013.

- [71] Beck GR, Ha S-W, Camalier CE, Yamaguchi M, Li Y, Lee J-K, et al. "Bioactive silica-based nanoparticles stimulate bone-forming osteoblasts, suppress bone-resorbing osteoclasts, and enhance bone mineral density in vivo." *Nanomedicine : Nanotechnology, Biology, and Medicine*; 8:793–803, 2012.
- [72] Ouis MA. Effect of ZnO on the Bioactivity of Hench's Derived Glasses and Corresponding Glass-Ceramic Derivatives. *Silicon*; 3:177–83, 2011.
- [73] Pyare AKSR. "Characterization of ZnO Substituted 45S5 Bioactive Glasses and Glass - Ceramics." *Journal of Materials Science Research*, 1, 2012.
- [74] Lusvardi G, Malavasi G, Menabue L, Menziani MC, Pedone A, Segre U "Properties of zinc releasing surfaces for clinical applications." *Journal of Biomaterials Applications*; 22:505–26, 2008.
- [75] Du RL, Chang J. The influence of Zn on the deposition of HA on sol-gel derived bioactive glass." *Bio-Medical Materials and Engineering*; 16:229–36, 2006.
- [76] Salman SM, Salama SN, Darwish H, Abo-Mosallam HA. "In vitro bioactivity of glass-ceramics of the $\text{CaMgSi}_2\text{O}_6\text{-CaSiO}_3\text{-Ca-5(PO}_4\text{)}_3\text{F-Na}_2\text{SiO}_3$ system with TiO_2 or ZnO additives. *Ceramics International*; 35:1083–93, 2009.
- [77] Bini M, Grandi S, Capsoni D, Mustarelli P, Saino E, Visai L. "SiO₂-P₂O₅-CaO Glasses and Glass-Ceramics with and without ZnO: Relationships among Composition, Microstructure, and Bioactivity." *Journal of Physical Chemistry*; 113:8821–8, 2009.
- [78] Lusvardi G, Zaffe D, Menabue L, Bertoldi C, Malavasi G, Consolo U. "In vitro and in vivo behaviour of zinc-doped phosphosilicate glasses." *Acta Biomaterialia* ; 5:419–28, 2009.
- [79] Ishikawa K, Miyamoto Y, Yuasa T, Ito A, Nagayama M, Suzuki K. "Fabrication of Zn containing apatite cement and its initial evaluation using human osteoblastic cells." *Biomaterials*; 23:423–8, 2002.

- [80] Saha N, Dubey AK, Basu B. “Cellular proliferation, cellular viability, and biocompatibility of HA-ZnO composites.” *Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials*, 100B:256–64, 2012.
- [81] Seil JT, Webster TJ. “Zinc oxide nanoparticle and polymer antimicrobial biomaterial composites.” *Proceedings of the 2010 IEEE 36th Annual Northeast Bioengineering Conference (NEBEC)*, 1–2, 2010.
- [82] Radev L, Zheleva D, Michailova I. “In vitro bioactivity of Polyurethane / 85S Bioglass composite scaffolds.” *Central European Journal of Chemistry*; 11, 2013.
- [83] Torre GC, Moller AD, Esparza-Ponce HE, A. E-MM. “Study of bioactivity , biodegradability and mechanical properties of polyurethane / nano-hydroxyapatite hybrid composites.” *International Journal of the Physical Sciences*; 6:6681–9, 2011.
- [84] Seil JT, Webster TJ. “Decreased astroglial cell adhesion and proliferation on zinc oxide nanoparticle polyurethane composites.” *Int J Nanomedicine*; 3:523–31, 2008.
- [85] Amna T, Hassan MS, Sheikh F a, Lee HK, Seo K-S, Yoon D, et al. “Zinc oxide-doped poly(urethane) spider web nanofibrous scaffold via one-step electrospinning: a novel matrix for tissue engineering.” *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97: 1725–34, 2013.
- [86] Machado HBP. “Suportes compósitos poliuretano/HA para aplicações ósseas de longo termo.” *Tese de Mestrado, Universidade de Aveiro, Aveiro*, 2007.
- [87] Vermette P. “Biomedical applications of polyurethanes.” *Landes Bioscience*; 2001.
- [88] Ulery BD, Nair LS, Laurencin CT. *Biomedical Applications of Biodegradable Polymers*. *Journal of Polymer Science Part B-Polymer Physics*; 49:832–64, 2011.
- [89] Geng J, Song G-H, Jia X-D, Cheng F-F, Zhu J-J. “Fast One-Step Synthesis of Biocompatible ZnO/Au Nanocomposites with Hollow Doughnut-Like and Other Controlled Morphologies.” *Journal of Physical Chemistry C*; 116:4517–25, 2012.

- [90] Cherng JY, Hou TY, Shih MF, Talsma H, Hennink WE. "Polyurethane-based drug delivery systems." *International Journal of Pharmaceutics*; 450:145–62, 2013.
- [91] Jayakumar R, Nanjundan S, Prabakaran M. "Metal-containing polyurethanes, poly(urethane-urea)s and poly(urethane-ether)s: A review." *Reactive & Functional Polymers*, 66:299–314, 2006.
- [92] Takada T, Kiyama M, Torii H, Asai T, Takano M, Nakanishi N. "Effect of pH values in the formation and solubility of zinc compounds." *Bull of Chemical Research*, 56, 1978.
- [93] Visking, "Medicell International Ltd," 13 9 2004. [Online]. Available: <http://www.visking.com/>. [Acedido em 2/4/2013].
- [94] Sing W, Everett H, Haul RAW, Moscou L, Pierotti, R. A. Rouquérol J, Siemieniowska T. "Reporting physisorption data for gas/solid systems with special reference to the determination of surface area and porosity." *International Union of Pure and Applied Chemistry*; 54, 1982.
- [95] Chakraborty S, Kole AK, Kumbhakar P. "Room temperature chemical synthesis of flower-like ZnO nanostructures." *Materials Letters*; 67:362–4, 2012.
- [96] Parthasarathi GT. "Synthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles and its application on fabrics for microbe resistant defense clothing." *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3, 2011.
- [97] Hsieh C. "Spherical Zinc Oxide Nano Particles from Zinc Acetate in the Precipitation Method." *Journal of the Chinese Chemical Society*: 31–4, 2007.
- [98] Guignot C, Betz N, Legendre B, Le Moel A, Yagoubi N. "Degradation of segmented poly(etherurethane) Tecoflex induced by electron beam irradiation : Characterization and evaluation." *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*; 185:100–7, 2001.

- [99] Machado HB, Correia RN, Covas JA. “Synthesis, extrusion and rheological behaviour of PU/HA composites for biomedical applications.” *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*; 21:2057–66, 2010.
- [100] Costa, MEV. Baptista, JL. “Characteristics of zinc oxide powders precipitated in presence of alcohols and amines”, *Journal of the European Ceramic Society*, 11:275-281, 1993.
- [101] Crisante F, Francolini I, Bellusci M, Martinelli A, D’Ilario L, Piozzi A. “Antibiotic delivery polyurethanes containing albumin and polyallylamine nanoparticles.” *European Journal of Pharmaceutical Sciences*; 36:555–64, 2009.